

# **Isolierung von pathogenetisch spezifischen Gensequenzen aus synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis**



## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen  
Fakultät III-Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Martin Judex  
aus Regensburg

2001

**Promotionsgesuch eingereicht am:**

16.10.2001

**Die Arbeit wurde angeleitet von:**

Prof. Dr. rer. nat. R. Wirth, Lehrstuhl für Mikrobiologie und  
PD Dr. med. U. Müller-Ladner, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

**Prüfungsausschuß:**

Vorsitzender	: Prof. Dr. G. Hauska
1. Gutachter (1. Prüfer)	: Prof. Dr. R. Wirth
2. Gutachter (2. Prüfer)	: PD Dr. med. U. Müller-Ladner
3. Prüfer	: Prof. Dr. A. Kurtz
Ersatzperson	: Prof. Dr. R. Baumann

Für meine Eltern

<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>2</b>
1.1. DAS MENSCHLICHE GELENK .....	2
1.1.1. Gelenkknorpel.....	2
1.1.2. Aufbau des Synoviums .....	2
1.1.3. Zellen der synovialen Deckzellschicht.....	3
1.2. RHEUMATOIDE ARTHRITIS.....	4
1.2.1. Soziale Folgen .....	5
1.2.2. Prävalenz.....	5
1.2.3. Hypothesen zur Entstehung der RA .....	6
1.3. ZIELSETZUNG.....	10
<b>2. MATERIAL.....</b>	<b>12</b>
2.1. VERWENDETE CHEMIKALIEN .....	12
2.2. VERWENDETE PCR-PRIMER .....	14
2.3. NÄHRMEDIEN UND PLATTEN:.....	16
2.4. VERWENDETE LÖSUNGEN:.....	17
2.4.1. Lösungen für die in situ Hybridisierung .....	17
2.4.2. Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung):.....	18
2.4.3. Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE): .....	18
2.4.4. Lösung für single strand conformation polymorphism (SSCP) Gele:.....	19
2.5. VERWENDETE KITS .....	19
2.6. GERÄTE .....	20
<b>3. METHODEN.....</b>	<b>21</b>
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	21
3.1.1. Asservation des Gewebes .....	21
3.1.2. Einfrieren des Gewebes .....	21
3.1.3. Gewinnung der Zellen aus dem Synovialgewebe.....	21
3.1.4. Zellkultur .....	21
3.1.5. Einfrieren / Auftauen der Zellen .....	22
3.1.6. Kontrollen.....	22
3.1.7. in situ Hybridisierung.....	22
3.1.8. Immunhistochemie .....	24
3.1.9. Chemotaxis .....	26
3.1.10. ELISA.....	28
3.1.11. Maus-OP.....	30
3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	31
3.2.1. RNA-Isolierung.....	31
3.2.2. RNA-Konzentrationsbestimmung.....	32
3.2.3. RAP-PCR.....	32
3.2.4. Reverse Transkription für RAP-PCR.....	33



3.2.5.	Durchführung der RAP-PCR (RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction) .....	33
3.2.6.	Herstellung des radioaktiv markierten Größenstandards .....	35
3.2.7.	PAA-Gelelektrophorese .....	36
3.2.8.	Bandenvergleich und Ausschneiden .....	37
3.2.9.	Elution und Reamplifikation .....	37
3.2.10.	SSCP (single strand conformation polymorphism) -Gel.....	38
3.2.11.	Elution und Reamplifikation aus dem SSCP-Gel, weitere Aufreinigung .....	38
3.2.12.	Klonierung der erhaltenen Fragmente .....	39
3.2.13.	Selektion positiver Kolonien.....	40
3.2.14.	Anlegen von Glyzerinkulturen zur dauerhaften Aufbewahrung.....	41
3.2.15.	Kontrolle der Insertlänge mittels PCR .....	41
3.2.16.	Sequenzierung und Datenbanksuche .....	41
3.2.17.	Primerdesign und -herstellung .....	42
3.2.18.	Bestätigung der differentiellen Expression mit semiquantitativer RT-PCR.....	42
3.2.19.	Reverse Transkription für QuantumRNA™ .....	43
3.2.20.	Überprüfung der Qualität der cDNA.....	43
3.2.21.	QuantumRNA™ -PCR.....	44
3.2.22.	Elektrophorese auf Novex®-Minigelen .....	44
3.2.23.	Phosphorimaging.....	44
3.2.24.	Herstellung der Sonden für die in situ Hybridisierung.....	45
3.2.25.	Realtime PCR mit dem LightCycler.....	46
3.2.26.	Realtime PCR mit dem TaqMan .....	50
3.2.27.	Steroidstimulierung synovialer Fibroblasten .....	51
3.2.28.	MOMeNT.....	52
3.2.29.	RNA-Isolierung aus Laserproben.....	53
3.2.30.	RAP-PCR aus MOMeNT-Proben .....	53
3.2.31.	Aufreinigung differentiell exprimierter Sequenzen.....	53
3.3.	RAP-PCR-MIKROARRAYS.....	54
3.3.1.	Herstellung der RAP-PCRs .....	54
3.3.2.	Herstellung der Sonden .....	56
3.3.3.	Hybridisierung.....	57
3.3.4.	Herstellung der RNA-Sonden .....	58
3.4.	P53-MUTATIONSANALYSEN.....	60
3.4.1.	DNA-Isolierung .....	60
3.4.2.	SSCP-Gelelektrophorese .....	60
3.4.3.	NIRCA (nonisotopic RNase cleavage assay).....	60
3.4.4.	BESS T-Scan.....	62
3.4.5.	Direktsequenzierung.....	63
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>64</b>
4.1.	ZELLKULTUR .....	64
4.2.	RAP-PCR.....	64

4.2.1.	Etablierung der RAP-PCR.....	64
4.2.2.	SSCP.....	65
4.2.3.	Vergleich der Sequenzdaten mit der Genbank.....	66
4.3.	KANDIDATENGENE.....	67
4.4.	CENP-E.....	67
4.4.1.	Bestätigung der differentiellen Expression mit semiquantitativer RT-PCR.....	67
4.4.2.	Auswertung der „QuantumRNA™ semiquantitative RT-PCR“ mit dem Phosphor-imager .....	68
4.4.3.	Überprüfung der Expression von CENP-E mit in situ-Hybridisierung .....	69
4.4.4.	Immunhistochemischer Nachweis.....	70
4.4.5.	Funktionelle Untersuchungen.....	70
4.4.6.	Klonierung der gesamten CENP-E-cDNA.....	71
4.5.	TAK1c, HAUSP, CYCLIN B UND NF-Y.....	71
4.6.	SDF-1 .....	72
4.6.1.	Semiquantitative RT-PCR.....	72
4.6.2.	Korrelation mit den Patientendaten .....	73
4.6.3.	SDF1-ELISA .....	76
4.6.4.	SCID-Maus-Versuche .....	77
4.6.5.	Immunhistochemie .....	77
4.6.6.	In-situ Hybridisierung .....	78
4.6.7.	Chemotaxis .....	78
4.7.	MOMENT .....	79
4.8.	RAP-PCR-MIKROARRAYS.....	81
4.8.1.	Herstellung der Arrays .....	81
4.9.	P53-MUTATIONSANALYSEN.....	84
4.9.1.	SSCP.....	84
4.9.2.	NIRCA.....	85
4.9.3.	BESS T-Scan.....	86
4.9.4.	Direktsequenzierung.....	87
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>88</b>
5.1.	RAP-PCR.....	88
5.2.	CENP-E.....	89
5.3.	SDF 1 .....	90
5.4.	LASERMIKRODISSEKTION UND RAP-PCR.....	94
5.5.	RAP-PCR-MIKROARRAYS.....	95
5.6.	P53-MUTATIONSANALYSEN .....	96
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>118</b>

## Abkürzungen

AK	Antikörper
AMV	Avian myeloblastosis virus
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinder-Serumalbumin)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
H <sub>2</sub> O bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
HANK'S, HBBS	<i>Balanced salt solution</i> nach Hank
IL	Interleukin
MMLV	Moloney murine leukaemia virus
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Botenribonukleinsäure)
PBMCs	<i>peripheral blood monocyctic cells</i> (Monozyten aus peripherem Blut)
PBS	<i>Phosphate buffered salt solution</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SSCP	single strand conformation polymorphism
Taq-Pol.	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

## 1. Einleitung

Die menschlichen Gelenke sind ein Komplex aus verschiedenen hochdifferenzierten Bindegewebsanteilen, die entstanden sind, um Stabilität und Bewegung zu ermöglichen. Sie sind aufgebaut aus Variationen dreier Moleküle: Kollagen, Proteoglykan und Glykoproteine. Die molekulare Zusammensetzung dieser Komponenten in einem Gewebe bestimmen seine Funktion und seine Eigenschaften. Mineralisiertes Kollagen ist Knochen. Kollagen in Verbindung mit bestimmten Proteoglykanen wird zu Gelenkknorpel. Kollagen mit geringen Mengen an Proteoglykanen bildet Bänder und Sehnen. Die Zellen, die diese Strukturmoleküle produzieren, besitzen auch die Fähigkeit, Enzyme zu synthetisieren, die sie um- und abbauen. Die Homöostase dieses wohlstrukturierten und differenzierten Systems ist bei der rheumatoiden Arthritis gestört (nach (Harris, 1997)).

### 1.1. Das menschliche Gelenk

#### 1.1.1. Gelenkknorpel

Knorpel besteht hauptsächlich aus einer Matrix aus Kollagen und Glykosaminoglykanen, die isolierte Chondrozyten umgibt. Den Hauptanteil des Kollagens stellt Kollagen Typ II (ca. 50% des Trockengewichtes von Knorpel). Kollagen Typ IX hat die wichtige Funktion, Kollagen Typ II und die Proteoglykane miteinander zu verknüpfen. Zur Elastizität des Knorpels trägt hauptsächlich ein „Supermolekül“ aus Hyaluronan, Aggrecan und Verbindungsproteinen bei. Bei Kompression des Knorpels führt die gegenseitige Abstossung der negativ geladenen Polysaccharidseitenketten dieses Moleküls dazu, daß der Knorpel wieder seine Ausgangsform annimmt, sobald die Belastung nachläßt. Auch die osmotischen Eigenschaften von Aggrecan tragen zu dieser Kompressionsresistenz bei. Weiterhin besteht die Knorpelmatrix aus mehreren anderen Glykoproteinen sowie aus geringen Anteilen an Kollagen Typ V, X und XI.

Chondrozyten, die weniger als 2% des Knorpelvolumens ausmachen (Stockwell.R.A. & Meachim, 1979), sind ausschliesslich verantwortlich für die Erhaltung der normalen Knorpelmatrix. Sie liegen, in sog. Lakunen eingebettet, isoliert in der Matrix und sezernieren Matrixkomponenten, matrixabbauende Enzyme sowie Zytokine.

#### 1.1.2. Aufbau des Synoviums

Das Synovium bedeckt die Innenseite des Gelenks mit Ausnahme von Gelenk- und Meniskusknorpel sowie kleinen Bereichen freiliegenden Knochens zwischen dem Knorpel und der Anheftestelle des Synoviums an den subchondralen Knochen (s. Abbildung 1).

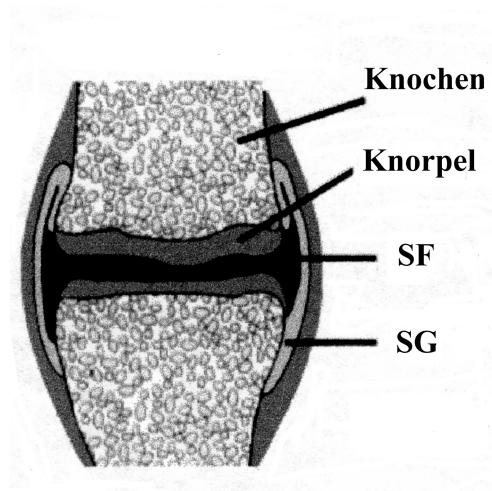


Abbildung 1: Schnitt durch ein normales Gelenk (SF: Synovialflüssigkeit; SG: Synovialgewebe; nach (Pettit & Thomas, 1999))

Da Synovium mesenchymalen Ursprungs ist, finden sich weder Epithelzellen noch eine echte Basalmembran, obwohl die meisten Komponenten der Basalmembran (ausser Entactin (Harris, 1997)) in Synovium vorhanden sind. Obwohl hier also keine klare Trennung verschiedener Zellschichten vorliegt, erfüllt die sich diffus zwischen den Zellen erstreckende „Basalmembran“ auch hier ihre Funktionen wie in anderen Geweben (Schutz der Zelloberfläche, Trennung der Zellen voneinander, Filtration von diffundierenden Molekülen).

Das Synovium ist aus ineinander übergehenden Schichten aufgebaut. Zum Gelenkspalt hin befindet sich die sog. synoviale Deckzellschicht („lining layer“), eine relativ dichte, normalerweise 2 – 4 Zellschichten dicke Struktur, die hauptsächlich aus fibroblasten- und makrophagenartigen Zellen besteht (Typ A- und Typ B-Synoviozyten, s.1.1.3). Daran schliesst sich eine Schicht aus verstreut liegenden Fibroblasten, Adipozyten, Blutgefäßen und lockerem Bindegewebe an („sublining“), die dann in die sehr kollagenhaltige, stabile Gelenkkapsel übergeht.

### 1.1.3. Zellen der synovialen Deckzellschicht

Die Zellen der synovialen Deckzellschicht werden als makrophagenartige Typ A- und als fibroblastenartige Typ B- Synoviozyten bezeichnet. Typ A-Zellen tragen viele Fortsätze und endocytische Vakuolen. Sie zeigen starke Expression von CD 68, weiterhin auch von CD11b, ICAM-1 und von MHC Klasse II- Molekülen. Im gesunden Gelenk tragen sie etwa 15% zur Gesamtzellmenge bei.

Typ B-Zellen, heute auch als synoviale Fibroblasten bezeichnet, sind gekennzeichnet durch einen aktiven Golgi-Apparat, was auf eine ihrer physiologischen Funktionen hinweist, die

Sekretion von Hyaluronan als „Schmiermittel“ in den Gelenkspalt sowie die Produktion von Faktoren, die notwendig sind für die Ernährung und Funktion des Knorpels. Auch bilden die Synoviozyten eine epithelartige Abgrenzung des Synoviums zum Gelenkspalt hin, was eine gewisse, für Fibroblasten eher ungewöhnliche, Polarisation bedingt. Gemeinsam mit den Makrophagen sind synoviale Fibroblasten wohl auch für die immunologische Überwachung des Gelenkspaltes sowie für die Phagozytose gelöster Knorpelfragmente und anderer „Zelltrümmer“ zuständig (Gulko *et al*, 2000). Ausserdem sezernieren sie bereits während der Entwicklung des Gelenks Moleküle wie z.B. sog. „bone morphogenetic proteins“ (BMPs, (Storm & Kingsley, 1996)), die für die Entstehung des Gelenks sowie für die Einwanderung und Differenzierung der synovialen Makrophagen von Bedeutung sind.

## 1.2. Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist nicht nur eine der häufigsten Gelenkerkrankungen, sondern auch eine der folgenschwersten. Sie ist gekennzeichnet durch synoviale Hyperplasie, chronische Entzündung und abnormale humorale und zelluläre Immunreaktionen und führt oft zur vollständigen Zerstörung der betroffenen Gelenke (Firestein GS, 1998; Gay *et al*, 1993). Die fortschreitende Gelenkdestruktion, die häufig zu Invalidität führt, unterscheidet die RA von den anderen Arthritiden.

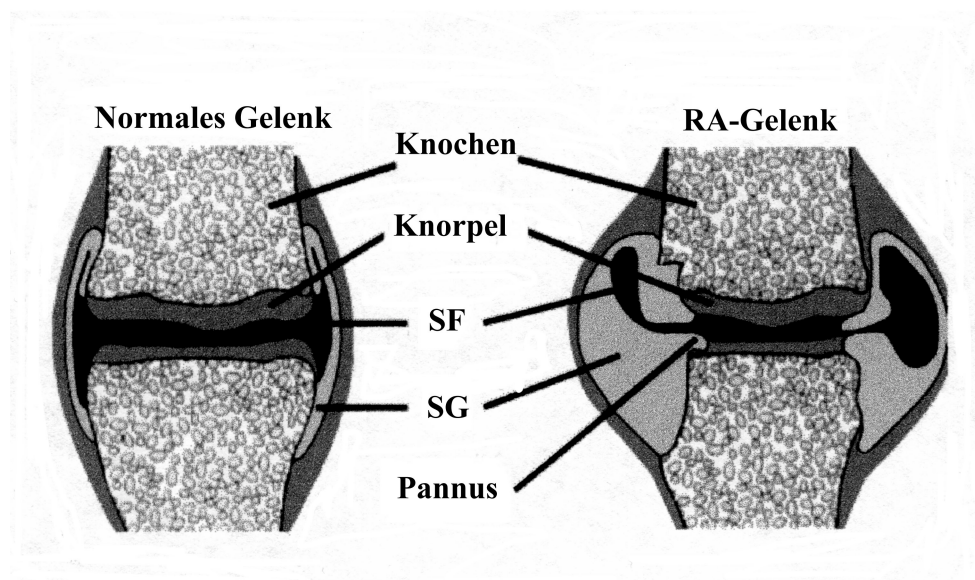


Abbildung 2: Ein Vergleich von gesundem und RA-Kniegelenk zeigt das hyperplastische Synovium, die Knorpel- und Knochendegradation sowie den invasiven Pannus (nach (Pettit & Thomas, 1999))

### 1.2.1. Soziale Folgen

Diese progrediente Gelenkzerstörung, zusammen mit permanenten Schmerzen, hat auch erhebliche Auswirkungen auf das tägliche familiäre Umfeld und das Berufsleben. Die Zahl der Arztbesuche pro Jahr ist z. B. bei Patienten mit rheumatoider Arthritis doppelt so hoch wie bei der Normalbevölkerung. Ähnliche Werte ergeben sich für die Zahl der Krankenhausaufenthalte. Auch die Notwendigkeit operativer Eingriffe, vor allem an den betroffenen Gelenken, ist ein erheblicher Kostenfaktor im Gesundheitswesen. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß die RA zu den teuersten Krankheiten gehört, wenn man die Aufwendungen für Diagnose, Therapie und Rehabilitation zusammen mit den verursachten Einkommensverlusten betrachtet (Arnett *et al*, 1988;Pincus, 1995). Berechnungen des „National Health Interview Survey“ gehen z.B. von jährlichen Kosten in den USA von 8,74 Mrd. US-Dollar oder 0,3% des Bruttoinlandsproduktes aus (Yelin, 1996). Unbehandelt führt die rheumatoide Arthritis auch heutzutage bei 50 % der Patienten innerhalb der ersten zwei Jahre der Erkrankung zu einer dauerhaften Schädigung der betroffenen Gelenke.

Rheumatoide Arthritis wird seit 1988 nach den aktualisierten Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) diagnostiziert ((Arnett *et al*, 1988), Tabelle 1).

1.	Morgensteifigkeit von mindestens 1 Stunde Dauer
2.	Arthritis von 3 oder mehreren Gelenken
3.	Arthritis der Hände (PIP, MCP, Handgelenke)
4.	Symmetrische Arthritis
5.	Rheumaknoten
6.	Rheumafaktor im Serum
7.	Radiologische Veränderungen (Erosionen/Osteoporose) an den betroffenen Gelenken

*Tabelle 1: Diagnosekriterien der rheumatoiden Arthritis. Für die Diagnose müssen 4 der 7 Kriterien erfüllt sein, die Kriterien 1 bis 4 müssen für mindestens 6 Wochen bestanden haben.*

### 1.2.2. Prävalenz

Bei Anwendung dieser Kriterien auf die mitteleuropäische bzw. nordamerikanische Bevölkerung zeigt sich eine Häufigkeit des Auftretens von RA von 0,3 % bis 1,5 %. Die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis ist bei Frauen ca. 2-3 mal höher als bei Männern.

Einzelne kleinere Bevölkerungsgruppen, zum Beispiel nordamerikanische Indianerstämme, weisen höhere Prävalenzen dieser Erkrankung von bis zu 6 % auf (Davidson *et al*, 1994), was eine genetische Komponente wahrscheinlich erscheinen läßt.

Auch die Tatsache, daß in manchen Familien die rheumatoide Arthritis gehäuft auftritt, und daß eineiige Zwillinge eine erhöhte Konkordanz für diese Erkrankung aufweisen (Jarvinen & Aho, 1994), spricht für eine genetische Beteiligung. Es läßt sich aus epidemiologischen Studien ableiten, daß ein Verwandter 1. Grades eine ca. 16fach höhere Wahrscheinlichkeit gegenüber der Normalbevölkerung hat, ebenfalls an einer rheumatoiden Arthritis zu erkranken.

In den vergangenen Jahren sind erhebliche Anstrengungen unternommen worden, die Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis aufzuklären. Die Verwendung neuer molekularbiologischer Untersuchungsmethoden, die Einführung neuer Tiermodelle und die Beobachtung sehr früher Krankheitsstadien haben zu einem besseren Verständnis der Prozesse geführt, die für die Entstehung der Krankheit relevant sind. Das Konzept eines Zusammenspiels verschiedener pathologischer Stoffwechselwege und Zelltypen (Gay *et al*, 1993; Pap T *et al*, 1999) hat dabei die Vorstellung von einer fast ausschliesslichen Dominanz T-Zell-gesteuerter immunologischer Mechanismen ergänzt, z.T. auch weitgehend ersetzt.

### 1.2.3. Hypothesen zur Entstehung der RA

Es werden derzeit verschiedene Modelle zur Entstehung der rheumatoiden Arthritis diskutiert, die hier kurz zusammengefasst werden sollen :

#### 1.2.3.1. Hypothese I: RA ist eine Infektionskrankheit

Ein infektiöses Agens wird seit über 70 Jahren als Auslöser der RA diskutiert. Obwohl es entzündliche Gelenkerkrankungen gibt, bei denen ein Erreger nachgewiesen werden konnte (z.B. Lyme-Arthritis (*Borrelia burgdorferi*) (Burmester *et al*, 1995), HTLV-I-Arthritis (*human T-lymphotrophic virus I*)(Nishioka *et al*, 1996)), und auch in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten virusähnliche Partikel gefunden wurden (Stransky *et al*, 1993), konnte doch bis heute kein einzelnes, definiertes Virus oder Bakterium als Erreger der RA identifiziert werden. Auch konnte keine räumliche oder zeitliche Häufung von RA-Fällen oder auch eine Übertragung z.B. durch Bluttransfusionen nachgewiesen werden, wie es bei einer Infektionskrankheit zu erwarten wäre. In Finnland wurde zwar eine regional unterschiedliche Inzidenz der RA nachgewiesen, diese wird jedoch eher auf Umweltfaktoren zurückgeführt (Kaipiainen-Seppanen *et al*, 2001). Es gibt allerdings Hinweise, daß RA nach unserer heutigen Definition in Europa vor der Entdeckung Amerikas durch Kolumbus 1492 nicht auftrat, während in den



USA 6000 Jahre alte Skelette gefunden wurden, die die typischen Veränderungen der rheumatoiden Arthritis aufwiesen (Rothschild *et al*, 1992).

#### 1.2.3.2. Hypothese II: RA ist eine T-Zell-abhängige Erkrankung

Bei Untersuchungen zum Histokompatibilitätsmuster von Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte sich eine signifikante Häufung eines sogenannten „shared epitope“, einer Aminosäuresequenz in der  $\beta$ -Kette des HLA-DR4- und -DR1-Komplexes (Gregersen *et al*, 1987). Auch waren Patienten mit aggressivem klinischem Verlauf signifikant häufiger positiv für HLA-DRB1\*0401 (MacGregor *et al*, 1995). Die auffällige Überrepräsentation des „shared epitope“ in den HLA-DR4- und -DR1-  $\beta$ -Ketten spricht für eine Beteiligung dieser Moleküle, die ein (noch nicht identifiziertes) Antigen an  $CD4^+$  T-Helferzellen präsentieren oder auch selbst als Antigen fungieren. Allerdings gilt dies nur für Patienten kaukasischen Ursprungs, Afrikaner und Asiaten zeigen diese Sequenz nur selten.

Das Vorhandensein großer Mengen an  $CD4^+$  T-Helferzellen im Synovium führte zur Suche nach RA-spezifischen T-Zell-Klonen. Solche Klone konnten allerdings bis heute nicht identifiziert werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, daß die meisten Untersuchungen mit Material von Patienten durchgeführt wurden, die bereits seit langem an RA litten. Es gibt jedoch Hinweise aus Tiermodellen (kollageninduzierte Arthritis der Maus (Van der Lubbe *et al*, 1994) sowie aus Untersuchungen an sehr frühen Stadien der RA (Ulfgren *et al*, 1995), daß T-Zell-abhängige Phänomene nur in frühen Stadien der Erkrankung eine Rolle spielen, sodaß sie in späten Stadien nicht mehr nachgewiesen werden könnten.

#### 1.2.3.3. Hypothese III: RA beginnt mit der Aktivierung und Proliferation synovialer Fibroblasten

Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, daß aktivierte Fibroblasten in der synovialen Deckzellschicht entscheidend an der Zerstörung von Knorpel und Knochen beteiligt sind (Firestein, 1996; Franz JK *et al*, 1999). Diese Zellen zeigen nicht nur eine veränderte Morphologie (Fassbender, 1983), sie verfügen auch über spezifische Eigenschaften, die sie von normalen synovialen Fibroblasten unterscheiden, Eigenschaften, die in ähnlicher Form auch bei Tumorzellen gefunden werden. Dazu zählen ein verändertes Wachstumsverhalten *in vitro* (Lafyatis *et al*, 1989) sowie die Fähigkeit, sich an Knorpelmatrix anzuheften und diese aktiv zu zerstören (Müller-Ladner *et al*, 1996).

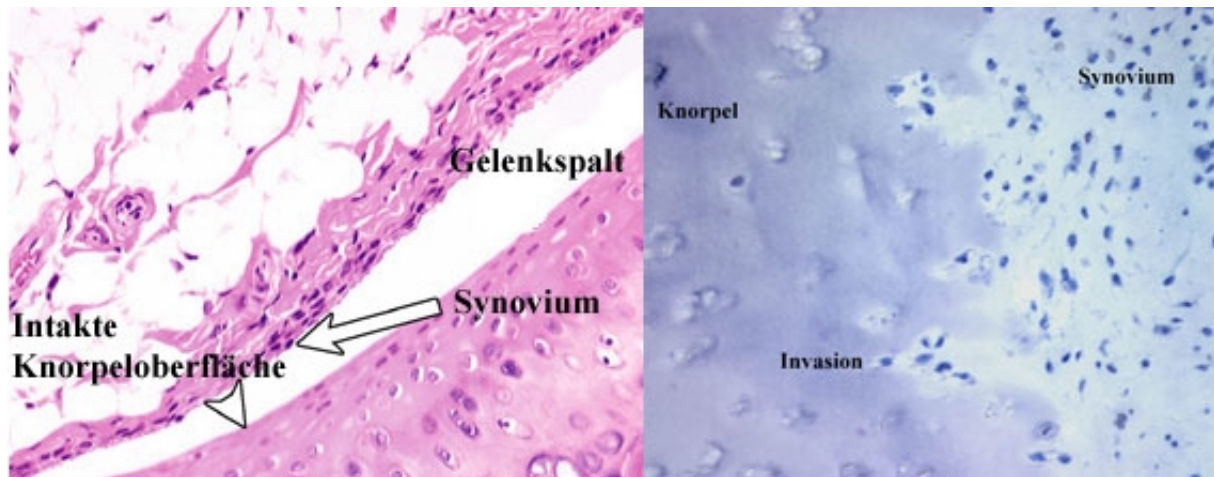


Abbildung 3: Schnitt durch ein gesundes Gelenk (links: Knie der Maus, Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und ein Kniegelenk eines RA-Patienten (rechts: Kernfärbung mit Hämatoxylin). Die den Knorpel zerstörenden Fibroblasten sind deutlich zu erkennen.

Diese Zellen werden daher auch als „aktivierte“ oder „transformiert erscheinende“ Fibroblasten bezeichnet. Die Charakterisierung dieser „transformiert erscheinenden RA-synovialen Fibroblasten“ (RA-SF) auf molekularer Ebene ergab, daß sie im Gegensatz zu normalen synovialen Fibroblasten oder auch synovialen Fibroblasten bei Osteoarthritis (OA, Arthrose), die meist als Kontrollgruppe verwendet werden, eine deutliche Hochregulierung von verschiedenen Proto-Onkogenen und Transkriptionsfaktoren zeigen. Der Ausdruck "Onkogen", der ursprünglich mit Tumoren assoziiert wurde, bedeutet hierbei nicht Malignität, sondern einen Marker für eine erhöhte Proliferation und/ oder gesteigerten Zellmetabolismus. Besonders hervorzuheben sind die physiologisch vorkommenden Proto-Onkogene, die eine wichtige Funktion in der Entwicklungsbiologie spielen und die erst durch bestimmte Stimuli oder Mutationen pathologisch wirksam werden. Allerdings wurden bisher keine RA-spezifischen Mutationen gefunden, obwohl die Suche nach Mutationen im proliferativen Synovium anhält. Ursache für die morphologischen Veränderungen scheint die Hochregulierung jener Proto-Onkogene zu sein, die unter anderem die metabolische Regulation von matrixabbauenden Enzymen steuern (Trabandt *et al*, 1992). Insbesondere die Produkte der Proto-Onkogene ras und myc konnten direkt in den am Knorpel anliegenden synovialen Fibroblasten zusammen mit den sauren Proteasen Kathepsin B und L sowie mit Kollagenase nachgewiesen werden (Trabandt *et al*, 1990; Trabandt *et al*, 1991). Auch Gensequenzen, die sofort nach initialer Aktivierung einer Zelle transkribiert werden, darunter das early growth response gene-1 (egr-1), lassen sich sowohl in kultivierten synovialen Fibroblasten über mehrere Zellpassagen als auch in zahlreichen Zellen im hyperplastischen Synovium nachweisen (Aicher *et al*, 1994).

Im allgemeinen sind solche aktivierenden Gene auch der Beginn einer Kaskade molekularer Schalter. So kodiert das Proto-Onkogen *sis* für eine Untereinheit des Wachstumsfaktors PDGF, die Produkte der *ras* Proto-Onkogene erhöhen die Sensitivität der Zelle für Wachstumssignale. Weitere im RA-Synovium hochregulierte Proto-Onkogene sind *fos* und *jun*, die zusammen mit *egr-1* an der Regulation der Kollagenaseproduktion beteiligt sind (Trabandt *et al*, 1992) und zusammen das Protein AP-1 (Aktivator-Protein-1) (Angel & Karin, 1991) bilden. Die Expression von Proto-Onkogenen und Transkriptionsfaktoren führt in einem sich zum Teil selbst unterhaltenden Prozess zur Hochregulierung und Aktivierung verschiedener Adhäsionsmoleküle und matrixabbauender Enzyme, die die Anheftung der RA-SF an den Gelenkknorpel und dessen Zerstörung vermitteln.

Auch eine gewisse Resistenz gegen Apoptose, den programmierten Zelltod, ist von Bedeutung für das aggressive Verhalten der RA-SF. Denn obwohl RA-SF vermehrt das Apoptose-induzierende Molekül Fas exprimieren (Asahara *et al*, 1996; Matsumoto *et al*, 1996; Nakajima *et al*, 1995) zeigte sich, daß nur wenige Zellen im RA-Synovium morphologische Zeichen der Apoptose aufweisen (Matsumoto *et al*, 1996; Nakajima *et al*, 1995) und eine auffällige Diskrepanz besteht zwischen der Expression von Fas und der Anzahl apoptotischer Zellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß in RA-SF trotz Expression von Fas durch Zugabe von FasL keine Apoptose induziert werden kann (Aicher *et al*, 1996). Es mehren sich die Hinweise, daß die Unfähigkeit synovialer Fibroblasten bei der RA, den programmierten Zelltod zu vollziehen bzw. auf entsprechende Stimuli adäquat zu reagieren, ein wichtiges Charakteristikum dieser Zellen ist (Aupperle *et al*, 1998). So wird z.B. auch das anti-apoptotisch wirkende Sentrin-1 durch die den Knorpel invadierenden Zellen vermehrt exprimiert (Franz *et al*, 2000). Von Interesse ist hier vor allem, daß Sentrin-1 an die zytoplasmatische Domäne des Fas bzw. des TNF-Rezeptors I bindet und eine Überexpression von Sentrin-1 Zellen effektiv vor Fas-induziertem Zelltod schützt (Okura *et al*, 1996). Auch andere anti-apoptotisch wirksame Proteine wie *bcl-2* werden in RA-SF vermehrt exprimiert, was für eine Involvierung apoptosehemmender Stoffwechselwege in die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis spricht. Die Verhinderung der Apoptose durch vermehrte Expression von anti-apoptotisch wirksamen Genprodukten ist ein Weg, der zu dem transformiert erscheinenden Phänotyp der synovialen RA-Fibroblasten beitragen könnte. Eine andere Möglichkeit wäre eine reduzierte Apoptose-rate durch Veränderungen in antiproliferativ wirkenden Genen wie z.B. in Tumorsuppressorgenen. Solche Mutationen in Tumorsuppressormolekülen wurden kürzlich auch für die RA beschrieben, insbesondere im *p53*-Gen (Firestein *et al*, 1997; Reme *et al*, 1998).

### 1.3. Zielsetzung

Wie die oben angeführten Untersuchungen gezeigt haben, gibt es zahlreiche Hinweise auf pathologisch veränderte Stoffwechselwege bei synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Eine exakte Charakterisierung dieser Mechanismen auf Gen- und Funktionsebene, vor allem im Vergleich mit synovialen Fibroblasten aus gesundem Synovium oder Synovium anderer Arthritiden, ist jedoch bisher nicht durchgeführt worden. Da es im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieansätze für die RA essentiell ist, diese veränderten Stoffwechselwege zu kennen, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, diese Fragestellung zu beantworten.

- Zunächst sollten RA-spezifisch dysregulierte mRNAs aus synovialen Fibroblasten isoliert und charakterisiert werden. Hierfür wurden zunächst Fibroblasten aus operativ entnommenem Synovialgewebe mittels Enzymverdauung isoliert und in Kulturflaschen angezüchtet. Nach Extraktion der RNA aus diesen Fibroblastenkulturen wurde diese in der „RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction“ (RAP-PCR) eingesetzt, um das Genexpressionsmuster dieser Zellen zu untersuchen. Als Kontrollen dienten ebenso gewonnene synoviale Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthritis und anderen Gelenkerkrankungen. Isolierte cDNA-Sequenzen sollten kloniert und sequenziert werden, um die zugehörigen Gene zu identifizieren.
- Die differentielle Regulation dieser Gene sollte sodann auf RNA-Ebene mit semiquantitativer RT-PCR und in situ-Hybridisierung an Gewebeschnitten sowie auf Proteinebene mit immunhistochemischen Nachweisverfahren bestätigt werden.
- Als weiteres Ziel dieser Arbeit sollten RA-Fibroblasten auf Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen untersucht werden, da bekannt ist, daß solche Mutationen zur Transformation von Zellen bei verschiedenen Karzinomen beitragen (Hollstein *et al*, 1996). RA-Fibroblasten erscheinen ebenfalls transformiert und zeigen eine Apoptoseresistenz, die pathophysiologisch von Bedeutung sein könnte. Da weiterhin bereits Berichte über p53-Mutationen bei mRNAs aus synovialen RA-Fibroblasten vorlagen (Firestein *et al*, 1997), sollten die hier gewonnenen Zellen darauf untersucht werden, ob diese Mutationen im Genom der synovialen Fibroblasten lokalisiert sind. Um die Gefahr falsch-negativer oder auch falsch-positiver Ergebnisse zu minimieren, kamen 4 verschiedene Mutationsanalyseverfahren zum Einsatz.
- Es zeigte sich im Verlauf der Arbeit, daß zur zuverlässigen Bestätigung der differentiellen Regulation bestimmter Gene im Fall einer sehr heterogenen Erkrankung wie der rheuma-

toiden Arthritis die Untersuchung möglichst vieler verschiedener Patienten-RNAs notwendig ist. Da etablierte Methoden hierfür nur bedingt einsetzbar sind, insbesondere wenn eine größere Anzahl an Genen untersucht werden soll, wurde während eines von BaCaTec geförderten zweimonatigen Aufenthalts am Sidney Kimmel Cancer Center (San Diego, USA) versucht, hierfür mit vorhandenen Proben eine neue Methode zu etablieren.

## 2. Material

### 2.1. Verwendete Chemikalien

Substanzen	Bezugsquellen
Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Agarose	FMC Bioproducts, Rockland/USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Amphotericin B	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit/USA
Bovine Serum-Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Amresco, Salon/USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Cye-dye-markierte Nukleotide	Amersham Pharmacia Biotech, Erlangen
DEPC	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dispase	Boehringer Mannheim
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Digoxigenin-UTP	Boehringer Mannheim
DMEM-Grundmedium	Biochrom KG, Berlin
DMF	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs
EDTA	Bio-Rad, Hercules/USA
FCS	PAA, Linz/Österreich
Formalin	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
HEPES	Seromed, Berlin
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen

Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Luria Broth	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Glücksklee, Frankfurt a. M.
MDE™ Gel solution	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin	Dianova, Hamburg
Natriumpyruvat	Biochrom KG, Berlin
NBT, 4-Nitro-Blau-Tetrazol-Chlorid	Boehringer Mannheim
NEAS	Biochrom KG, Berlin
Neu Fuchsin-Färbelösung	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
OCT Tissue Tek	Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
photographisches Fixiermedium	Kodak, Stuttgart
PBS-Puffer	PAA, Linz/Österreich
Penicillin	PAA, Linz/Österreich
Restriktionsenzyme	NEB (New England Biolabs, Frankfurt)
RPMI1640-Grundmedium	Gibco BRL, Eggenstein
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Fluka, Buchs
Streptomycin	PAA, Linz/Österreich
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	PAA, Linz/Österreich
Whatman-Papier	Whatman, Maidstone/ UK
X-Gal	Gibco BRL, Eggenstein
Xylenxanol	Sigma, Deisenhofen
Zellkulturflaschen	Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten, 6-Loch	Falcon, Heidelberg

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

## 2.2. Verwendete PCR-Primer

Primer	Sequenz	Verwendung
Kinase A-	5' - CCA AAT GCA CCT TCA CC - 3'	RAP-PCR
Kinase A1+	5' - GAG GGT GCC TT - 3'	RAP-PCR
Kinase A2+	5' - GGT GCC TTT GG - 3'	RAP-PCR
Nuclear 1+	5' - ACG AAG AAG AG - 3'	RAP-PCR
Nuclear 1-	5' - TTG CTC TTC TT - 3'	RAP-PCR
Nuclear 2+	5' - AAG AAG AGC AA - 3'	RAP-PCR
Nuclear 2-	5' - CTC TTC TTG GT - 3'	RAP-PCR
OPN 21	5' - ACC AGG GGC A - 3'	RAP-PCR
OPN 21 nested	5' - CCA GGG GCA C - 3'	RAP-PCR
OPN 23	5' - CAG GGG CAC C-3'	RAP-PCR
OPN 24	5' - AGG GGC ACC A - 3'	RAP-PCR
OPN 25	5' - GGG GCA CCA G - 3'	RAP-PCR
OPN 28	5' - GCA CCA GGG G - 3'	RAP-PCR
OPN 29	5' - CAC CAG GGG C- 3'	RAP-PCR
US 2	5' - GAC AGT GGT G - 3'	RAP-PCR
US 6	5' - GTG GTG ACA G - 3'	RAP-PCR
US 9	5' - GTG ACA GAC A - 3'	RAP-PCR
MJ 1	5'-GAC CAG TTG AC - 3'	RAP-PCR
MJ 2	5'-CTT CAG AAG CC- 3'	RAP-PCR
MJ 3	5'-CCA ATT GAG TT- 3'	RAP-PCR
MJ 4	5'-GAG ATG ACG ACC- 3'	RAP-PCR
Hurra 1	5'-GAA CTG CTG AC- 3'	RAP-PCR
Hurra 2	5'-TCC AGT TAC GC- 3'	RAP-PCR
Hurra 3	5'-CAC CCG TAG TC- 3'	RAP-PCR
WB 1	5'-ATG GAC GGT AG- 3'	RAP-PCR
WB 2	5'-GAA CTC CGA GT- 3'	RAP-PCR
WB 3	5'-TAC GAT TAC GT- 3'	RAP-PCR
18S-PCR- Primer_for	5' - TCA AGA ACG AAA GTC GGA G - 3'	Quantum
18S-PCR- Primer_rev	5' - GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA - 3'	Quantum



M13 for	5' - CGT TGT AAA ACG ACG GCC AG - 3'	Plasmid-PCR
M13 rev	5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC AT - 3'	Plasmid-PCR
CENP_f	5' - CAG ATG CCA AGG AAG TCT TC - 3'	Quantum
CENP_r	5' - GCA CCT TCA CCA AGA TTG TG - 3'	Quantum
SDF_for	5' - CCT GCA TTT ATA GCA TAC GG - 3'	Quantum, TaqMan
SDF_rev	5' - CCA GTA ATA GTG GCT TCT AC - 3'	Quantum, TaqMan
SDF_neu for	5' - CAT GAA CGC CAA GGT CGT GG - 3'	LightCycler
SDF_neu rev	5' - GCT TCG GGT CAA TGC ACA CT - 3'	LightCycler
CXCR4 for	5' - GAA CCA GCG GTT ACC ATG GA - 3'	LightCycler
CXCR4 rev	5' - CAG GTG CAG CCT GTA CTT GT - 3'	LightCycler
1S	5' - CCT GAG GTG TAG ACG CCA ACT CTC T-3'	NIRCA
1AS	5'-ACT TTG CAC ATC TCA TGG GGT TAT-3'	NIRCA
2S	5'-GGC CTC CCC TGCTTG CCA-3'	NIRCA
3 AS	5'-ACG GCA TTT TGA GTG TTA GAC-3'	NIRCA
T7#1	5'-GAT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTT GCA GGA GGT GCT TA-3'	NIRCA
T7#2	5'-GAT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCC ACA GGT CTC CCC AA-3'	NIRCA
SP6#1	5'-TCA TTT AGG TGA CAC TAT AGG ACT GCT CAC CCG GAG GGC CAC TGA C-3'	NIRCA
SP6#3	5'- TCA TTT AGG TGA CAC TAT AGG ACT GGA AAC TTT CCA CTT-3'	NIRCA
PU4	5'-CAC CCA TCT ACA GTC CCC CTT GC-3'	P53-SSCP; BESS- T-Scan
PD7	5'-CAA GTG GCT CCT GAC CTG GAG TC-3'	P53-SSCP; BESS- T-Scan
PU7	5'-GTG TTG TCT CCT AGG TTG GCT CTG-3'	P53-SSCP; BESS- T-Scan
M13F-21	5'-TTG TAA AAC GAC GGC CAG T - 3'	Sequenzierung
M13R-22	5'-TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C-3'	Sequenzierung

### 2.3. Nährmedien und Platten:

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

<b>LB<sub>0</sub> (Luria broth)</b>	Bacto Trypton (Difco, Detroit, USA)	10 g
	Yeast Extract (Difco, Detroit, USA)	5 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
	Mit 1 N NaOH pH 7,2 einstellen	
	Für LB <sub>0</sub> -Platten: Agar (Difco, Detroit, USA)	12 g
	zugeben, autoklavieren	
<b>X-Gal-Indikatorplatte</b>	LB <sub>0</sub> -Platte mit: X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylβ <sub>D</sub> <sup>-</sup> Galactopyranosid) in Dimethylformamid (Stammlösung: 40 mg/ml) Ampicillin	40 µl 100 mg/l
<b>Fibroblastenmedium</b>	Dulbeccos modified eagle medium (DMEM; 1 g/l Glucose)	500 ml
	Fötales Kälberserum	50 ml
	Penicillin/Streptomycin 1%	5 ml
	Amphotericin B (1 mg/ml)	0,5 ml
	Hepes	5 ml

## 2.4. Verwendete Lösungen:

### 2.4.1. Lösungen für die in situ Hybridisierung

100X Denhardt's Lösung :	Ficoll 400	10g
	Polyvinylpyrrolidon	10g
	BSA	10g
	mit H <sub>2</sub> O bidest. auf 500 mL auffüllen	
20X SSC	NaCl	175.3g
	Sodium Citrate	88.2g
	in H <sub>2</sub> O bidest. lösen	
	pH-Wert mit 10M NaOH auf ~7.0 einstellen	
	auf 1l auffüllen	
STE	NaCl	500 mM
	Tris-Cl (pH 7.5)	20 mM
	EDTA (pH 8.0)	1mM
Prähybridisierungspuffer	Formamid	50%
	Denhardt's Lösung	1x
	SSC + Dextransulfat	8x (50 % w/v Dextransulfat gelöst in 20x SSC)
	Heringsspermien-DNA	2,5 mg (für 10 min bei 65° hitzedenaturiert)
	Hefe-t-RNA	1,25 mg
Lösung A	20x SSC	5 ml
	Formamid	25 ml
	H <sub>2</sub> O bidest.	20 ml
Lösung B1	1x SSC	150 ml
	SDS (20%)	1,5 ml
Lösung B2	0,5x SSC	150 ml
	SDS (20%)	1,5 ml
Lösung B3	0,1x SSC	150 ml
	SDS (20%)	1,5 ml

NBT/BCIP Farblösung	Tris-HCl	10 mM
	NaCl	100 mM
	PVA (Polyvinylalkohol)	10%
	MgCl <sub>2</sub>	5mM
	BCIP	0,2 mg/ml
	NBT	0,5 mg/ml
	Levamisol	1 mM

#### 2.4.2. Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung):

<b>TAE (50 x)</b>	Tris/Acetat pH 8,0	2 M
	EDTA pH 8,0	50 mM
<b>Ladepuffer</b>	Glycerin	5,5 ml
	Bromphenolblau	25 mg
	Xylencyanol	25 mg
	EDTA (0,5 M)	2 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
<b>DNA-Agarosegel</b>	Agarose	1–2 % (w/v)
	gelöst in TAE (1 x)	
	Ethidiumbromid	0,01 %

#### 2.4.3. Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE):

<b>TBE (10 x)</b>	Tris (hydroxymethyl) aminomethan	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	3,72 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
<b>PAGE Stammlösung</b>	Urea	226,8 g
	TBE (10 x)	54 ml
	Acrylamid/ Bisacrylamid (19:1)	90 ml
	40 %	
	H <sub>2</sub> O	216 ml

<b>PAGE Gebrauchslösung</b> <b>6,7 %</b>	PAGE Stammlösung	75 ml
	Ammoniumpersulfat (10 %)	600 µl
	TEMED	75 µl
<b>Ladepuffer</b>	Formamid	10 ml
	Xylenxanol	10 mg
	Bromphenolblau	10 mg
	EDTA 0,5 M pH 8,0	0,2 ml

#### 2.4.4. Lösung für single strand conformation polymorphism (SSCP) Gele:

<b>SSCP Stammlösung</b>	2 x MDE™ Gel solution	25 ml
	(FMC®, Rockland, USA)	
	TBE (10 x)	6 ml
	Glycerin 98 %	10 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
<b>SSCP Gebrauchslösung</b>	SSCP Stammlösung	100 ml
	Ammoniumpersulfat (10%)	400 µl
	TEMED	40 µl

#### 2.5. Verwendete Kits

Verwendungszweck	Name	Hersteller
RNA-Isolierung und -aufreinigung	RNeasy	Qiagen, Hilden
Plasmidpräparation	Qiaprep Plasmid Miniprep	Qiagen
DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen	Qiaquick Gel Extraction	Qiagen
Herstellung von RNA- Sonden	MAXIscript™	Ambion, Austin, TX
Mutationsnachweis	Mismatch Detect II	Ambion
Mutationsnachweis	BESS-T-Scan	Epicentre Technologies (Biozym, Hessisch Olden- dorf)

Semiquantitative RT-PCR	QuantumRNA™	Ambion
Semiquantitative RT-PCR (LightCycler)	FastTrack SYBRGreen kit	Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.6. Geräte

Robot Microbeam laser microscope	P.A.L.M., Bernried
PE 7700 Thermocycler	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Vertikale Gelelektrophoresekammer Modell S2	Gibco BRL Life Technologies (jetzt Invitrogen, Karlsruhe)
Gene Analyzer 9700 („TaqMan“)	PE Applied Biosystems
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Storm 860 Phosphorimager	Molecular Dynamics (jetzt Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
LICOR Sequencer	LiCor Biosciences, Lincoln, NE
OmniGrid-Roboter	GeneMachines (San Carlos, CA)
ScanArray 5000	GSI Lumonics (Packard Biochip Technologies, Billerica, MA).

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1. Asservation des Gewebes

Das für die Versuche verwendete Synovialgewebe sowie die hieraus isolierten Fibroblasten wurden von insgesamt mehr als 200 Patienten der orthopädischen Universitätsklinik Regensburg in Bad Abbach im Rahmen von Routineoperationen (Synovektomie, Gelenkersatz) asserviert.

##### 3.1.2. Einfrieren des Gewebes

Besonders wichtig für die Durchführung der Versuche war, daß das Gewebe nach der Operation möglichst schnell verarbeitet wurde. In der Regel lagen die primären Verarbeitungszeiten unter 15 Minuten. Ein Teil des Gewebes wurde umgehend in Gefriermedium (OCT Tissue Tek) eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

##### 3.1.3. Gewinnung der Zellen aus dem Synovialgewebe

Der zweite Teil des operativ entnommenen Gewebes wurde nach einem etablierten Verfahren enzymatisch aufgearbeitet, um die darin enthaltenen Fibroblasten für die Kultur zu gewinnen. Hierzu wurde ein synoviales Gewebstück manuell in ca.  $0,5 \text{ mm}^3$  große Stücke zerschnitten und 1 Stunde bei  $37^\circ \text{C}$  in steriler DispaseLösung gerührt. Die Zellsuspension wurde abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Verbleibende Gewebestücke wurden verworfen. Nach Abzentrifugation bei 1.200 U/min für 10 min wurden die Zellen in DMEM gewaschen und in  $75 \text{ cm}^2$ -Kulturflaschen transferiert. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde das Medium gewechselt, um letzte Gewebereste und nicht adherierende Zellen zu entfernen

##### 3.1.4. Zellkultur

Die Fibroblastenkultur erfolgte dann bis zur RNA- und DNA-Gewinnung in Fibroblastenmedium (2.3) unter kontrollierten sterilen Bedingungen über mehrere Passagen, um eine Kontamination von nicht an der Plastikkulturflasche anhaftenden Zellen (z.B. Makrophagen) auszuschließen.

Die Fibroblasten wurden bei 90 % Konfluenz mit Trypsin von den Zellkulturflaschen abgelöst. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin (2,5% Trypsin im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt) überschichtet und für 5-10 min im Brutschrank bei  $37^\circ \text{C}$  inkubiert. Die abge-

lösten Zellen wurden mit 5 ml Medium aufgenommen, bei 1.200 U/min für 10 min abzentrifugiert und in Medium resuspendiert. Jeweils 1/3 der Zellen wurde in einer neuen Kulturflasche ausgesät und das Medium alle 3 Tage gewechselt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

### 3.1.5. Einfrieren / Auftauen der Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurde ein Teil der Zellen eingefroren. Hierzu wurden die Zellen abtrypsiniert, bei 1.200 U/min für 10 min zentrifugiert, in 4 ml Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO; eiskalt) wieder aufgenommen und auf zwei Einfrierröhrchen (je 2 ml/ Röhrchen) verteilt. Die Röhrchen wurden über Nacht bei -80°C in einem Einfrierbehälter, der ein Abkühlen der Zellen mit 1°C pro min gewährleistete, eingefroren. Anschliessend wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

#### *Auftauen der Zellen*

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch eine kurzzeitige Wärmebehandlung des Einfrierröhrchens (2 min, 37°C-Wasserbad). Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes PBS gegeben, bei 1.200 U/min abzentrifugiert und in Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt.

Nach 12 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter passagiert (s.o.).

### 3.1.6. Kontrollen

Eine zusätzliche Kontrolle zur Reinheit der Fibroblasten erfolgte mittels Immunhistochemie (z. B. APAAP-Färbung, 3.1.8.2) unter Verwendung von Fibroblastenantikörpern (Hoyhtya *et al*, 1984) und Makrophagenantikörper gegen CD11b, CD14 und CD68. Die Kulturen wurden ausserdem regelmäßig mittels PCR auf eine mögliche Mycoplasmenkontamination überprüft.

### 3.1.7. in situ Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung gehört derzeit zu den Standardtechniken zur Detektion von mRNA in Zellen verschiedenster Gewebe, wobei die nicht-radioaktive Markierung der verwendeten Sonden inzwischen eine ähnliche Sensitivität und Spezifität erreicht, wie die der ursprünglich hierfür verwendeten radioaktiven Sonden (Chan-Palay *et al*, 1988; Clavel *et al*, 1991; Denijn *et al*, 1990; Dorries *et al*, 1993; Furuta *et al*, 1990; Giaid *et al*, 1989). Im Gegensatz zur - gegenüber äußeren Bedingungen - relativ unempfindlichen Immunhistochemie müssen aber bei der in situ Hybridisierung mehrere Einflußfaktoren beachtet werden. Hierzu gehört vor allem a) die absolute Vermeidung einer RNase-Kontamination von Beginn des Herstellens des Gefrierschnittes bis zum Abschluß der Hybridisierungsphase; b) die laufende Überwachung der



Farbentwicklung am Ende der in situ Hybridisierung, um ein möglichst gutes Signal- zu -Rauschverhältnis zu erhalten und c) die Anpassung der Gewebeverdauung nach erfolgter Hybridisierung und Entwicklung zum Erreichen eines optimalen Signals in der Doppelmarkierung.

Die Sondenherstellung zum Nachweis der einzelnen mRNAs erfolgte aus den die entsprechende cDNA-enthaltenden Plasmiden (s.3.2.24). Hierbei wird mittels RNA-Polymerasen (aus den Phagen SP6 und T7) entweder die zur mRNA komplementäre Antisense-Sonde, welche an die gesuchte mRNA bindet, oder die als Kontrolle verwendete Sense-Sonde, welche dem kodierenden DNA-Strang entspricht, aus der cDNA im Plasmid überschrieben.

Es wurden Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 5  $\mu\text{m}$  verwendet, die nach kurzer Lufttrocknung für 1h bei Raumtemperatur in 3% Paraformaldehyd fixiert wurden.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte dann in einer RNase-freien feuchten Kammer mehrfach gewaschen. Zunächst erfolgte ein Waschschrift mit 2x SSC für 5 min, dann wurde 2x mit Triethanolamin-HCl (0,1M, pH 8,0) gespült. Dann wurde für 30 min mit 0,25% Acetanhydrid in Triethanolamin-HCl angesäuert und nochmals 2-3x mit Triethanolamin-HCl gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit Prähybridisierungspuffer.

Die eigentliche Hybridisierung erfolgte dann über 12 Stunden, wobei jede Sonde in mehreren Verdünnungen (ca. 5-200 ng/Gewebeschnitt) appliziert und zur Bindung in einer feuchten Kammer, die mittels Deckgläschen abgedeckt und mit Nagellack versiegelt wurde, inkubiert wurde. Als Hybridisierungspuffer fungierte der oben beschriebene Prähybridisierungspuffer, in dem die RNA-Sonde verdünnt und für 10 min bei 80°C denaturiert worden war. Als Hybridisierungstemperatur hat sich eine Temperatur von 50-52°C bewährt. Diese Temperatur musste mittels eines Hybridisierungsofens innerhalb von  $\pm 2^\circ \text{C}$  während der gesamten Hybridisierungszeit konstant gehalten werden. Eine zusätzliche Kontrolle bietet die Hybridisierung mit der Sense-Sonde, die lediglich eine minimale Bindung an das Gewebe aufweisen darf. Nach der Hybridisierung und Abnehmen des Deckgläschens erfolgten wiederum mehrere Waschschriffe, zunächst 3x mit 2x SSC, dann 2x mit 2x STE.

Zum Entfernen ungebundener Sonden schloss sich hierauf ein einstündiger Verdau mit RNase A bei 37° an (40  $\mu\text{g/ml}$  in STE). Es folgten diverse stringente Waschschriffe, zunächst 3x mit STE, dann für 5 min bei 50° mit Lösung A, 3x mit 2x SSC, abschliessend dann für je 15 min mit den Lösungen B1, 2 und 3 bei 50°.

Der Nachweis erfolgte dann immunhistochemisch unter Verwendung von Anti-Digoxigenin-Antikörpern. Diese Antikörper bestehen nur aus einem Fab-Fragment gegen Digoxigenin

(Boehringer, Mannheim), welches an alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Damit werden zwei Risiken unspezifischer Bindung vermieden, zum einen die unspezifische Bindung der Fc-Teile eines Antikörpers an im Synovium stark exprimierte Fc-Rezeptoren und weiterhin die Vermeidung von Peroxidase als Farbentwicklungsenzym, da das Synovium reich an endogener Peroxidase ist, welche sich auch nicht vollständig hemmen läßt.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte zunächst für 30 min bei Raumtemperatur mit 2%igem Normalserum in Tris-NaCl (0,1M Tris, 0,2M NaCl, pH 7,6) geblockt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte ebenfalls in 2%igem Normalserum in Tris-NaCl für 1h bei Raumtemperatur. Nach gründlichem Waschen der Objektträger mit Tris-NaCl und einem zwanzigminütigen Alkalisierungsschritt in 10 mM Tris-HCl pH 9,0/ 100 mM NaCl erfolgte die Farbentwicklung mit NBT/BCIP im Dunkeln.

In der Regel benötigt die Farbentwicklung zwischen 30 und 240 Minuten bei Raumtemperatur. Sollte die alkalische Phosphatase-Signalentwicklung aufgrund zu geringer Genexpression unbefriedigende Ergebnisse erbringen, so kann zum Digoxigeninnachweis auch die Immunogold-Silbertechnik (3.1.8.1) verwendet werden. Im Unterschied zur Immunhistochemie werden hier direkt Gold-markierte Antidigoxigenin-Antikörper verwendet und nachfolgend mit der photochemischen Entwicklung sichtbar gemacht.

### 3.1.8. Immunhistochemie

#### 3.1.8.1. Immunogold-Silbertechnik

Für diese Technik wurden Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 4-6 µm verwendet. Diese wurden für 10 Minuten in eiskaltem Aceton (-20°C) fixiert und danach luftgetrocknet. Die Blockung der unspezifischen Bindungsstellen (Fc-Rezeptoren) erfolgte mittels 2 % normalem Serum der Tierart, aus der der jeweilige Sekundärantikörper gewonnen wurde, und 4 % Trockenmilchpulver in Trispuffer pH 7,4 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Waschen der Schnitte in Trispuffer wurden diese für 45-60 Min. oder über Nacht bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern in Konzentrationen von 1-20 µg/ml inkubiert. Die hierfür verwendeten Antikörper werden bei den einzelnen Ergebnissen jeweils separat unter den Bildunterschriften beschrieben. Als Kontrollen für die Versuche dienten jeweils speziesspezifische Immunglobuline. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Gewebeschnitte in Trispuffer gewaschen und nachfolgend mit dem sekundären biotinylierten Antikörper, welcher gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet war, für 45 Minuten in einer Verdünnung von 1:600 in Trispuffer/ 2% Magermilch inkubiert. Nach erneutem Waschen in Trispuffer wurden danach die Schnitte mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin (Dianova) für 45 Minuten in einer Verdünnung von 1:600 in Tris-Puffer be-

schickt, hierbei bindet sich das Streptavidin spezifisch an das Biotin des sekundären Antikörpers. Zum Abschluß erfolgte die Inkubation mit Antikörpern gegen Meerrettichperoxidase, an die 6 nm große Goldpartikel gebunden waren. Die Verdünnung dieser Antikörper betrug 1:40, die Inkubationszeit 60 Minuten.

Die Signalentwicklung erfolgte danach photochemisch in der sogenannten Immunogold-Silberreaktion, welche in einer Modifikation des ursprünglichen Protokolls von Komminoth und Mitarbeitern (Komminoth, 1992) durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Gewebsschnitte zunächst noch einmal in Trispuffer gewaschen und danach mittels 3%igem Glutaraldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Der erste Schritt der photochemischen Silberverstärkungsreaktion beinhaltete die Inkubation mit Hydrochinon (2,5 mg/ ml), der zweite Schritt die Inkubation mit der eigentlichen Entwicklungslösung, die 2,5 mg/ ml Hydrochinon und 2 mg/ ml Silberacetat enthielt. Die Entwicklungszeit betrug in der Regel 18-20 Minuten, die Entwicklungsreaktion wurde dann mit H<sub>2</sub>O bidest. abgestoppt. Danach erfolgte die Fixierung mittels photographischem Fixiermedium für eine Zeitdauer von 2 Minuten. Nach der Fixierung und einer nochmaligen intensiven Waschung wurden entweder direkt die Deckgläschen zur Beurteilung der Färbung aufgebracht oder eine Doppelmarkierung mittels der APAAP-Immunhistochemie (3.1.8.2) angeschlossen.

### 3.1.8.2. Alkalische Phosphatase / Anti-Alkalische Phosphatase-Immunhistochemie (APAAP)

Sowohl die Direktmarkierung von Antigenen als auch die Doppelmarkierung nach der in situ Hybridisierung wurden mittels dieser Technik durchgeführt. Zusätzlich war zur Freilegung der Antigene nach der Doppelfixierung im Rahmen der Immunogold-Silberentwicklung meist ein Verdauungsschritt mit Trypsin (2-10 mg/ ml für 10 Minuten) notwendig. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper in Trispuffer erfolgte das Aufbringen des Brückenantikörpers (Ziege-Anti-Maus-Antikörper oder Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper) für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:400 (Dianova, Hamburg). Nach ausgiebiger Waschung mit Trispuffer erfolgte die Bindung des Primär/Sekundär-Antikörperkomplexes an den APAAP-Komplex. Hierbei reagiert der sekundäre Antikörper mit den alkalischen Phosphatasemolekülen im APAAP-Komplex. Nach 30 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Farbentwicklung nach Alkalisierung mittels Trispuffer (pH 9,7) unter Verwendung der Neu-Fuchsin-Färbelösung. Je nach Intensität des Antigens und der Farbentwicklung konnte die Farbreaktion nach frühestens 5 Minuten beendet werden.

### 3.1.9. Chemotaxis

Mit dem Chemokin SDF-1 wurden auch Chemotaxisversuche durchgeführt. Hierzu wurden zunächst PBMCs aus Spenderblut isoliert; alternativ wurden auch Fibroblasten aus der Zellkultur verwendet.

#### 3.1.9.1. Isolierung von PBMCs

25 ml Vollblut, die zur Gerinnungshemmung direkt nach der Entnahme mit 0,2 ml Heparin vermischt wurden, wurden in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorsichtig über 15 ml Ficoll geschichtet. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 600 g wurde der Überstand abgenommen und die PBMCs 3x mit je 5 ml HBSS gewaschen. Zur Trennung der Phasen erfolgte zwischen den Waschschritten jeweils eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 400 g. Anschliessend wurde die PBMC-Schicht abgenommen, mit 2 ml HBSS resuspendiert und die Zellzahl in einem Neubauer-Hämozytometer bestimmt.

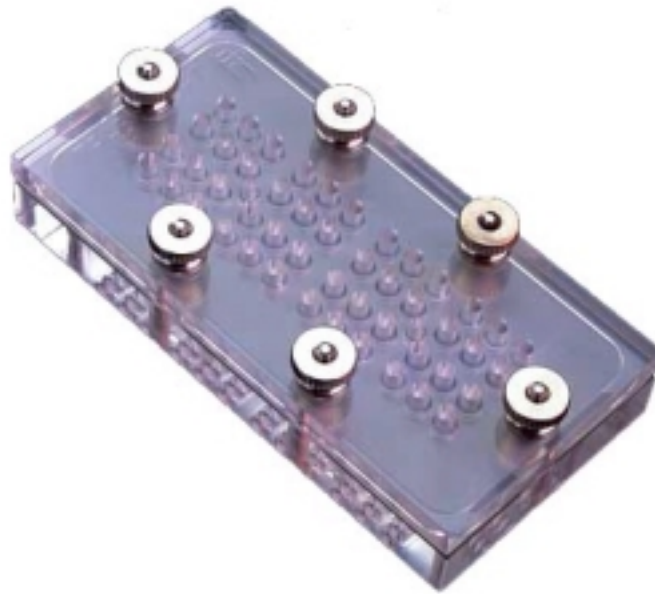
#### 3.1.9.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mikroskopisch mit dem Neubauer-Hämozytometer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Lebende Zellen erschienen farblos, tote Zellen wurden blau gefärbt. Aus der gut suspendierten PBMC-Lösung wurde ein Aliquot steril entnommen, mit Trypanblau-Lösung verdünnt und im Hämozytometer unter dem Mikroskop mit dem 10-er Objektiv

ausgewertet. Dabei wurden die vier sich diagonal gegenüberliegenden und 16-fach unterteilten Quadrate ausgezählt. Die Gesamtzellzahl pro ml ergab sich aus der erhaltenen Zellzahl multipliziert mit 2.500 unter Berücksichtigung der Verdünnung.

### 3.1.9.3. Chemotaxis

Die Chemotaxisexperimente wurden in einer Boydenkammer durchgeführt. Diese besteht aus einem zweiteiligen Plexiglasblock mit 48 Vertiefungen (Abbildung 4).



*Abbildung 4: Boydenkammer, von oben gesehen*

Der obere und untere Teil des Blocks werden von einer Polycarbonatmembran mit Poren definierter Größe (8  $\mu\text{m}$ ) getrennt. Um eine gerichtete Wanderung von Zellen nachzuweisen, wird die untere Hälfte der Vertiefungen mit dem chemotaktisch wirkenden Medium gefüllt, in die obere Hälfte gibt man die Zellen, deren Wanderung untersucht werden soll. Anschliessend wird dieser Aufbau für mehrere Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann entfernt man die Polycarbonatmembran, schabt die auf der Oberseite anhaftenden Zellen ab und färbt die auf der Unterseite haftenden Zellen, die aktiv durch die Poren der Membran gewandert sein müssen, da diese Poren einen kleineren Durchmesser als die untersuchten Zellen besitzen. Durch Auszählung der Zellzahl im Mikroskop lässt sich dann die Anzahl der Zellen bestimmen, die auf den jeweiligen Stimulus reagiert haben, relativ zu einer jeweils mitgeführten Negativ- und Positivkontrolle.

#### 3.1.9.4. Aufbau des Experiments

Zunächst wurde sog. konditioniertes Medium hergestellt, indem RA- und OA-Fibroblasten, die möglicherweise einen chemotaktisch wirksamen Faktor produzieren, für 48 h mit serumfreiem Medium inkubiert wurden. Dieses Medium stellt dann das konditionierte Medium dar. Alternativ wurde serumfreies Medium verwendet, dem SDF-1 in definierten Mengen beige-mischt wurde.

Dieses Medium wurde sodann in die untere Hälfte der Chemotaxiskammer pipettiert, und zwar so, daß ein leicht positiver Meniskus entstand (ca. 31,6 µl/ Vertiefung). Dann wurde mittels zweier Pinzetten die Polycarbonatmembran, die zuvor über Nacht mit sterilem einprozentigem BSA in PBS beschichtet worden war, aufgebracht. Wichtig war hierbei insbesondere die Vermeidung von Luftblasen und von Kontamination mit Medium aus benachbarten Vertiefungen. Anschliessend wurde eine Silikondichtung und dann die obere Hälfte der Kammer aufgesetzt und mit Rändelschrauben befestigt. Die PBMCs wurden in die obere Hälfte der Vertiefungen gegeben, und zwar 50.000 Zellen pro Vertiefung, suspendiert in 50 µl Hanks BSS. Die Wanderung der Zellen erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei 37° und 10% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Wurden Fibroblasten verwendet, so wurden lediglich 20.000 Zellen, suspendiert in serumfreiem DMEM-Medium, eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug hier 6 Stunden.

Anschliessend wurde die Kammer zerlegt und die Oberseite der Membran mit PBS befeuchtet. Die an der Oberseite anhaftenden Zellen wurden an einer Gummilippe abgeschabt. Die Färbung der Membran erfolgte nach Trocknung über Nacht mit dem Hämacolor Kit der Fa. Merck.

Zur Auswertung wurde die Membran auf einem Objektträger befestigt und die Zellen, die die Membran durchwandert hatten, ausgezählt. Es wurden pro Vertiefung 3 Gesichtsfelder gezählt, aus den so erhaltenen Daten wurde dann jeweils der Mittelwert gebildet.

#### 3.1.10. ELISA

Es wurde zunächst versucht, einen ELISA für SDF-1 selbst zu entwickeln. Hierzu wurden folgende Antikörper auf ihre Verwendbarkeit getestet:

Antikörper	Hersteller	Katalognummer
Mouse anti-human SDF1 Ak	R&D Diagnostics, Wiesbaden	AF-310-NA
Biotinylated goat-anti-human SDF1	R&D Diagnostics	BAF310
Monoclonal anti-human/ mouse SDF1	R&D Diagnostics	MAB 350
SDF1 (C-19) goat polyclonal	Santa Cruz Biotech, Heidel-	SC-6193

	berg	
Biotinylated goat-anti-human SDF1	RDI, Flanders, NJ	RDI-SDF1-abg-EBT
Mouse anti-human SDF1 Ak	RDI	RDI-SDF1Aabm-EL

*Tabelle 2: Verwendete SDF1-Antikörper*

Sie wurden jeweils in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen in folgendem Protokoll eingesetzt:

Benötigte Puffer:

Beschichtungspuffer: 0,1 M Natriumhydrogencarbonat

Waschpuffer: 0,2% Triton-X100 in PBS, pH 7,4

Blockierlösung: 10% FCS in Waschpuffer

TMB-Lösung: 1 TMB-Tablette in 5 ml H<sub>2</sub>O bidest.

Phosphat / Citratpuffer: 1 Tablette in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.

Substratlösung: 1 Teil TMB-Lösung  
1 Teil Phosphat / Citratpuffer  
0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Eine 96-well-Platte wurde mit 100 µl/ well Beschichtungspuffer, dem 2 µg/ml anti-human SDF-1 Antikörper zugesetzt waren, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen (100 µl/ well). Anschließend wurden die noch unbesetzten freien Bindungsstellen des Kunststoffes mit 300 µl/ well Blockierungspuffer 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem Spülen der Platte mit Waschpuffer wurden 100 µl/ well des verdünnten (bzw. unverdünnten) Zellkulturüberstandes sowie der Standardverdünnungsreihe in die Vertiefungen pipettiert. Die Platte wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl/ well des in Waschpuffer verdünnten Sekundärantikörpers (100 ng/ml) auf die 96-well-Platte gegeben. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die ELISA-Platte wiederum dreimal gewaschen, bevor 100 µl/ well des Streptavidin-HRP-Konjugates (im Verhältnis 1:4.000 in Waschpuffer) für 20 min zupipettiert wurden. Die Platte wurde erneut dreimal gewaschen, nach Zugabe von 100 µl/ well Substratlösung für 10-30 min im Dunkeln inkubiert, und die Farbreaktion mit 50 µl/ well 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die proportional zur Konzentration auftretende Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei 450-540 nm bestimmt.

Leider gelang es nicht, einen zuverlässig funktionierenden ELISA herzustellen. Daher wurde dann der seit August 2000 erhältliche SDF-1-ELISA der Firma R&D Diagnostics nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 3.1.11. Maus-OP

Um zu untersuchen, ob RA-Fibroblasten, die sich in ihrer SDF1-Produktion unterscheiden, auch Unterschiede in der Aggressivität gegenüber humanem Knorpel zeigen, wurde das SCID-Maus-Modell der rheumatoiden Arthritis verwendet. Hierbei werden humaner Knorpel und Fibroblasten gemeinsam in Mäuse implantiert, die aufgrund eines schweren Immundefektes (SCID= severe combined immunodeficiency) humanes Gewebe nicht abstossen können. Nach ca. 6 Wochen werden die Implantate entfernt und in Paraffin eingebettet. Hieraus werden Dünnschnitte hergestellt, anhand derer die Invasion der Fibroblasten in den Knorpel bestimmt werden kann.

4 Wochen alte SCID-Mäuse wurden von einer keimfreien Zucht (Charles River, Sulzfeld) bezogen und vor sowie während der Operation auf makroskopisch sichtbare Anomalien untersucht. Am Tag der Implantation wurde normaler menschlicher Knorpel von nichtarthritischen Gelenken von Patienten gewonnen, die sich in der Orthopädischen Klinik der Universität einer Routineoperation unterzogen.

Die Implantation von kultivierten Fibroblasten und dem humanen Knorpel wurde unter sterilen Bedingungen mittels der „inverse wrap“-Methode durchgeführt (Judex *et al*, 2001). Hierbei wird ein würfelförmiges Stück inerte Schwamm (ca. 80 mm<sup>3</sup>) aufgeschnitten und ein ca. 3 – 5 mm<sup>3</sup> grosses Stück Knorpel in den Schwamm eingebettet. Anschliessend wird der Schwamm mit in steriler Kochsalzlösung resuspendierten Fibroblasten (~5 x 10<sup>5</sup> Zellen) getränkt.

Die Maus wurde mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin und Xylazin (75 mg/ kg bzw. 11,25 mg/ kg Körpergewicht) betäubt. Anschliessend wurde ihre Haut auf der linken Körperseite chirurgisch eröffnet und die Haut vom Bindegewebe etwas abgehoben, um eine Tasche zu erhalten. In diese Unterhauttasche wurden sodann zwei fibroblastengetränkte Schwämme mit Knorpel eingesetzt. Für die Versuche wurden Fibroblasten von folgenden Patienten verwendet: RA 24, RA 29, RA 50, RA 51, RA 52, RA 55, RA 78, RA 91.



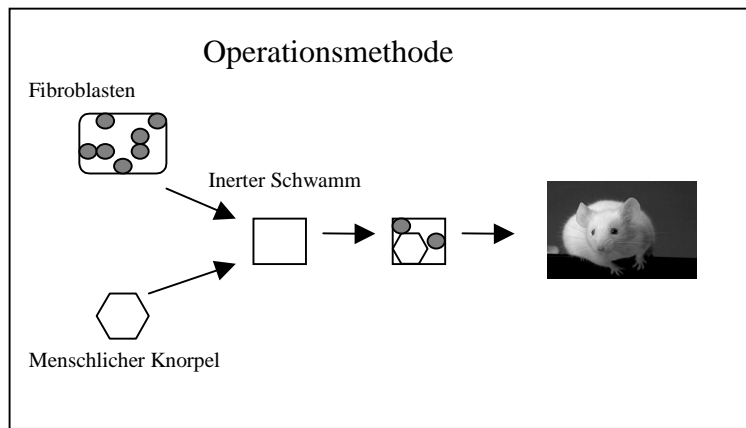


Abbildung 5: Schema der „inverse wrap“-Operationsmethode

Anschließend wurde die Haut mit einem chirurgischen Faden vernäht und die Maus bis zum Aufwachen warmgehalten.

Nach 45 Tagen wurden die Mäuse mittels CO<sub>2</sub> tierschutzgerecht getötet, die Implantate wurden entnommen und in Formalin eingelegt. Nach 4 h wurden sie in 60%iges Ethanol umgelagert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Aus diesen Präparaten hergestellte Dünnschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entfärbt.

Die Auswertung erfolgte nach einem etablierten Schema (Müller-Ladner *et al*, 1996). Folgender score wurde verwendet:

Invasion: 0 = keine oder minimale Invasion; 1: sichtbare Invasion ( $\approx$  2 Zelldurchmesser tief, 20 – 30  $\mu$ m); 2 = Invasion (5 Zelldurchmesser); 3 = tiefe Invasion ( $\approx$  10 Zelldurchmesser).

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. RNA-Isolierung

Nach 2-6 Passagen wurde aus den kultivierten Fibroblasten RNA isoliert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen wurden 2x mit je 5 ml PBS gewaschen und mit 600  $\mu$ l RLT-Lysepuffer (aus dem „RNeasy Mini Kit“, mit 6  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt) überschichtet. Sie wurden mit einem Zellkulturschaber vom Boden der Flasche gelöst. Das Zelllysats wurde entweder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder sofort über Qia-Shredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert und die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Als zusätzlicher Schritt wurde ein 30-minütiger DNase-Verdau auf der Säulenmembran eingefügt, um die Kontamination mit genomischer DNA zu minimieren.

### 3.2.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde mit RiboGreen (Molecular Probes) im SpectraFluor Plus Fluoreszenzspektrophotometer (Tecan, Crailsheim) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt, da RNA in verdünnter Lösung, wie sie hier vorlag, mit diesem Fluoreszenzfarbstoff wesentlich exakter zu quantifizieren ist als über die Absorption bei 260 nm im Photometer. Anschliessend wurden die für die RAP-PCR notwendigen Stammkonzentrationen (100, 50, 25 ng/µl) vorbereitet und bei -80°C gelagert.

### 3.2.3. RAP-PCR

Die der RAP-PCR zugrundeliegende Methode der „arbitrarily primed PCR“ wurde ursprünglich entwickelt, um, ähnlich wie Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP), in der Taxonomie, Phylogenie, bei Mutationsanalysen und in anderen Bereichen Verwendung zu finden (Welsh *et al*, 1991; Welsh & McClelland, 1990). Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens, die sog. RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR) dient dazu, einen repräsentativen Querschnitt durch die von den untersuchten Zellen exprimierten mRNAs zu erhalten. Der Vergleich mit Kontrollgruppen ermöglicht so die Identifizierung zellspezifisch hoch- oder herunterregulierter Gene.

Um dieses Ziel zu erreichen, überschreibt man zunächst die isolierte RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase und eines ersten arbiträren Primers in cDNA. In einem PCR-Schritt mit einem zweiten arbiträren Primer wird dann der sog. Fingerprint erzeugt. Arbiträre Primer sind kurze Oligonukleotide (10 – 15 Basen lang), die unter den gewählten, wenig stringenten Bedingungen innerhalb weniger hundert Basenpaare an den einen oder den anderen Strang der cDNA binden. Unter den hier verwendeten Bedingungen ist es für eine Bindung ausreichend, daß der grössere Teil des Primers an die DNA bindet, eine perfekte Übereinstimmung ist nicht erforderlich. Eine weniger perfekte Bindung an einer Seite kann durch eine sehr gute Übereinstimmung auf der anderen Seite des Primers kompensiert werden (McClelland *et al*, 1995).

Von Bedeutung ist hier zum einen, daß die so erzeugten PCR-Produkte unter den gleichen Bedingungen wieder erzeugt werden können, der Fingerprint ist also reproduzierbar. Weiterhin korreliert das Verhältnis der Intensitäten zweier Banden mit der Konzentration der zugrundeliegenden mRNA, der Fingerprint spiegelt somit auch die Häufigkeit einzelner mRNAs wieder (Tortola *et al*, 1998; Welsh *et al*, 1992). Ein entscheidender Vorteil ist weiterhin die Tendenz zur bevorzugten Vervielfältigung seltener mRNAs, (Mathieu-Daude *et al*,

1996a;McClelland *et al*, 1995) was das Auffinden mit anderen Methoden bisher nicht erkannter Unterschiede ermöglicht.

#### 3.2.4. Reverse Transkription für RAP-PCR

Die reverse Transkription der RNA für die RAP-PCR erfolgte nach einem Protokoll von Welsh und McClelland (Welsh *et al*, 1992). Folgende Komponenten wurden in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß gemischt:

10x RT-Puffer*	1 µl
100 mM DTT	1 µl
dH <sub>2</sub> O	1,2 µl
1. arbiträrer Primer	0,8 µl
10 mM dNTP	0,4 µl
MMLV-RT (200 U/µl)	0,1 µl
RNAse Inhibitor	0,5 µl
RNA	5 µl

\*10x Puffer: 500 mM Tris pH 8,3, 500 mM KCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub>

Die reverse Transkription erfolgte dann in einem PE 9700 Thermocycler mit folgenden Bedingungen: langsames Aufheizen über 5 min von 25° auf 37° (hierbei erfolgt das Anlagern des Primers an die RNA), dann 60 min Inkubation bei 37°, anschliessend Deaktivierung der MMLV-RT für 15 min bei 68°.

Es wurden stets drei verschiedene RNA-Mengen (500, 250, 125 ng) eingesetzt, um bei der Bewertung des Bandenmusters Fehlinterpretationen auszuschließen, die durch Qualitäts- und Konzentrationsunterschiede der Proben entstehen können (McClelland *et al*, 1995). Nach erfolgter cDNA-Synthese wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 50 µl aufgefüllt.

Als Kontrolle wurde die reverse Transkription ohne Zugabe der reversen Transkriptase durchgeführt, um eine eventuelle Rest-DNA-Kontamination im nachfolgenden PCR-Schritt sicher erkennen zu können.

#### 3.2.5. Durchführung der RAP-PCR (RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction)

Die RAP-PCR erfolgte für die Versuche in einer Modifikation der Erstbeschreibung von Welsh und McClelland (Welsh *et al*, 1992). Folgender Ansatz wurde hergestellt:

10x Taq-Stoffel-Puffer (PE Applied Biosystems)	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3,2 µl
dH <sub>2</sub> O	2,6 µl
2. arbiträrer Primer (100 µM)	0,8 µl
10 mM dNTP	0,8 µl
Stoffelfragment der Taq-Polymerase (10 U/ µl) (PE)	0,4 µl
α- <sup>32</sup> P- dCTP (3000 Ci/mM, Amersham-Pharmacia)	0,2 µl
cDNA	10 µl

Die PCR erfolgte dann im PE 9700 bei folgenden Bedingungen:

5 min      95°

35 Zyklen: 30 s      94°C

30 s      35°C

1 min      72°C

Es folgte ein abschliessender Extensionsschritt über 7 min bei 72°C.

Die hier verwendeten Primerkombinationen können prinzipiell durch freie Variationen optimiert werden, durch die Kooperation mit dem Labor von Dr. McClelland standen zahlreiche Primerkombinationen zur Verfügung, die sich bereits bei anderen Fragestellungen als effektiv erwiesen hatten. Verwendet wurden folgende Kombinationen:

<b>RT</b>	<b>PCR</b>
OPN21	US6
OPN 21	Nuclear 1+
OPN 21	Kinase A-
OPN 24	US9
OPN 24	Kinase A2+
OPN 29	Kinase A-
OPN 29	US6
US6	Nuclear 1+
US6	Kinase A2+
Nuclear 2+	US6

Nuclear 2+	Kinase A2+
US9	US6
US9	Kinase A2+

### 3.2.6. Herstellung des radioaktiv markierten Größenstandards

Zur Bestimmung der Bandengröße wurde ein radioaktiv markierter Größenstandard benötigt. Verwendet wurde hierzu mit MspI verdautes pBR322-Plasmid. Die beim Restriktionsverdau entstehenden Einzelstrangenden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und radioaktivem dCTP aufgefüllt. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

10x universal buffer (Stratagene)	8 µl
MspI-pBR 322-Verdau (New England Biolabs)	1 µl
10 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Klenow-Fragment (Promega)	2 µl
5 mM dAGT	2 µl
α <sup>32</sup> P-dCTP (3000 Ci/ mM, Amersham-Pharmacia)	2 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	21 µl

dAGT ist eine Mischung von dGTP, dTTP und dATP zu gleichen Teilen.

Der Ansatz wurde in ein 1,5 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß pipettiert und für 30 min bei 37° inkubiert. Dann wurden 2 µl 5 mM dNTP und 1 µl Klenow-Fragment zugegeben und für weitere 15 min bei 37° inkubiert. Anschliessend wurde die DNA durch Zugabe von 4 µl 3M Na-Acetat und 110 µl eiskaltem Ethanol p.a. gefällt. Der gefällte Marker wurde abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die DNA getrocknet und in 100 µl TE-Puffer wieder aufgenommen.

Der Marker liefert folgende Banden (Größe in bp):

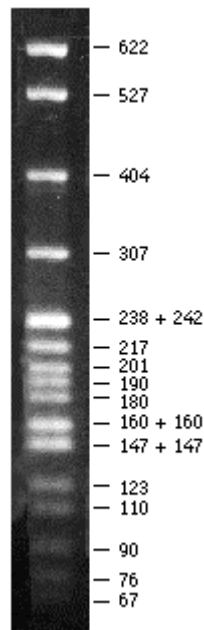


Abbildung 6: Bandengrößen des verwendeten radioaktiven Markers (pBR 322, verdaut mit *MspI*)

### 3.2.7. PAA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese der radioaktiv markierten PCR-Produkte aus der RAP-PCR wurde auf einem 5%igen Polyacrylamidgel in einer vertikalen Sequenzgelapparatur (Gibco BRL Life Technologies (jetzt Invitrogen, Karlsruhe), Modell S2) durchgeführt.

Die Gellösung wurde zwischen 2 Glasplatten gegossen, von denen eine mit Acrylase (Stratagene, Amsterdam/NL) vorbehandelt wurde, um das spätere Ablösen des Gels zu erleichtern. Nach einer zumindest einstündigen Polymerisationszeit wurde das Gel in die Apparatur eingesetzt und für ca. 30 min bei einer Leistung von 150 W vorgewärmt, bis es eine Temperatur von 45° C erreicht hatte. Dies wurde durch einen aufgeklebten Temperaturfühler überwacht. Die Proben wie auch der Größenmarker wurden 1:1 mit Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95° im Heizblock denaturiert und nebeneinander in die Geltaschen geladen. Entscheidend war der Vergleich zwischen der cDNA von Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis. Die Beladung der Taschen des Gels erfolgte daher nebeneinander in die Krankheitsgruppen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Leistung von 100 W bei einer konstanten Temperatur von 45° für ca 1,5 h. Nach erfolgtem Lauf wurde das Gel auf 3MM-Whatman-Filterpapier transferiert und auf einem Geltrockner (Gel Dryer Model 583, Biorad, München) bei 80°C für 1-2 h getrocknet. Zur autoradiographischen Darstellung der Banden wurde anschliessend ein Kodak BioMax<sup>®</sup> Film aufgelegt und über Nacht exponiert. Die Filmentwicklung erfolgte in

einem RP X-OMAT Processor (Model M6B, Eastman Kodak Company, Rochester, USA). Um das Gel anschliessend wieder mit dem Film zur Deckung bringen zu können, wurden Stratagene<sup>®</sup> Fluoreszenzmarker in den Ecken des Gels angebracht.

### 3.2.8. Bandenvergleich und Ausschneiden

Es wurden jeweils die differentiell exprimiert erscheinende Bande sowie ein Gelfragment in der anderen Patientengruppe, in der die Bande nicht oder nur sehr schwach vorhanden ist, nach folgendem Schema mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten:

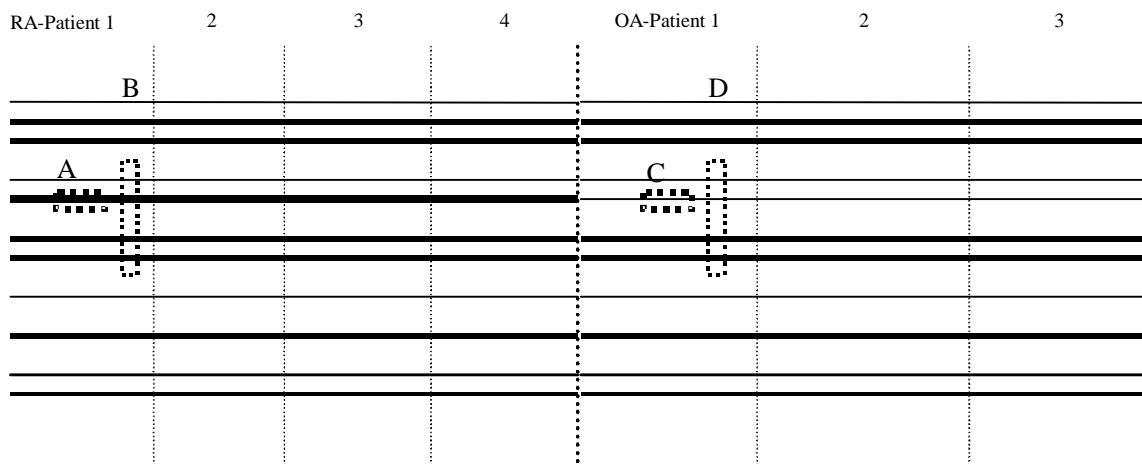


Abbildung 7: Ausschneiden differentiell exprimiert erscheinender Banden

Ausserdem wurde auch auf jeder Seite ein Gelfragment ausgeschnitten, daß die interessierende Bande sowie darüber und darunter einige prominente Banden enthielt. Der Grund hierfür ist, daß sich der Unterschied in der Stärke zweier Banden, der im Fingerprint gesehen wird, bei der nun folgenden Reamplifikation manchmal verliert, da hier der kompetitive Effekt durch andere Produkte sehr viel geringer wird. Um Unterschiede auch in diesen Fällen sichtbar zu machen, verwendet man neben der eigentlich interessierenden Bande (+) und der „Negativbande“ aus der anderen Patientengruppe (-) immer auch jeweils einen Gelausschnitt, bei dem durch das Vorhandensein mehrerer Ausgangs-DNA-Fragmente dieser kompetitive Effekt gewahrt wird (Mathieu-Daude *et al*, 1996b).

### 3.2.9. Elution und Reamplifikation

Die PCR-Fragmente wurden durch eine dreistündige Inkubation bei 68° in 50 µl TE-Puffer aus dem Gel eluiert und unter Verwendung derselben Bedingungen wie in 3.2.5 reamplifi-

ziert, nun allerdings nur noch für 20 Zyklen, um ein Angleichen der Bandenintensitäten in den verschiedenen Proben durch Erreichen der stationären Phase der PCR zu vermeiden (Mathieu-Daude *et al*, 1996a).

### 3.2.10. SSCP (single strand conformation polymorphism) -Gel

Zur weiteren Reinigung erfolgte dann eine SSCP-Gelelektrophorese. Bei dieser Methode werden DNA-Doppelstränge hitzedenaturiert, die Elektrophorese wird dann aber in einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel durchgeführt. Die Einzelstränge können daher eine ihrer Sequenz entsprechende Konformation einnehmen, die ihr Laufverhalten beeinflusst. Dies ermöglicht die Auftrennung mehrerer Fragmente gleicher Größe, aber unterschiedlicher Sequenz, wie sie bei der hier verwendeten Methode vorkommen können (Mathieu-Daude *et al*, 1996b).

Das SSCP-Gel wurde wie oben beschrieben aus der Stammlösung gegossen. Die PCR-Produkte wurden 1:1 mit SSCP-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95° im Heizblock denaturiert und dann die jeweils zusammengehörigen Produkte (A, B, C, D, s. Abbildung 7) nebeneinander in die Geltaschen geladen. Der Lauf erfolgte in 0,6x TBE-Puffer über 12 h bei einer konstanten Leistung von 5W. Anschliessend wurde das Gel wieder auf Whatmanpapier aufgezogen, getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition erfolgte wiederum über Nacht.

### 3.2.11. Eluation und Reamplifikation aus dem SSCP-Gel, weitere Aufreinigung

Aus dem SSCP-Gel wurden wiederum die differentiell exprimiert erscheinenden Banden ausgeschnitten, durch dreistündige Inkubation bei 68° in TE-Puffer eluiert und reamplifiziert. Die Reamplifikation wurde unter denselben Bedingungen wie in 3.2.5 durchgeführt, diesmal allerdings ohne radioaktives dCTP.

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden dann auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf etwa 50°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und in die Taschen des Gels geladen.

Als Größenstandard wurde eine Probe mit Fragmenten bekannter Größe mitgeführt (z.B. 100bp-Leiter, Gibco Life Technologies). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt für etwa 20 Minuten.

Nach einer Überprüfung der Bandengröße wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QiaQuick gel extraction kit der Fa. Qiagen die DNA aus der Agarose gelöst. Das



QiaQuick gel extraction kit basiert auf dem Auflösen des Agaroseblöckchens in 3M Natriumiodidlösung bei 50° und anschließender Aufreinigung der DNA über ein Säulchen, das eine DNA-bindende Silicagelmatrix enthält.

### 3.2.12. Klonierung der erhaltenen Fragmente

Das erhaltene Fragment eines vermutlich differentiell exprimierten Gens wurde nun mittels des TOPO<sup>™</sup> TA Cloning<sup>®</sup>-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in den Vector PCR II Topo kloniert. Topo cloning ist ein modifiziertes T/A-Klonierungssystem. Taq-Polymerase hat eine matrix-unabhängige terminale Transferaseaktivität, d.h. sie fügt ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende eines PCR-Produktes an. Der PCR II-Topo-Vektor besitzt an jedem Ende einen 3' Desoxy-Thymidin-Überhang, der mit Topoisomerase aktiviert ist (Abbildung 8). Dies ermöglicht die kovalente Verknüpfung von PCR-Fragment und Vektor durch eine einfache fünfminütige Inkubation in einer Salzlösung mit einer Endkonzentration von 200 mM NaCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub> bei Raumtemperatur, unabhängig von der Sequenz des PCR-Produktes.

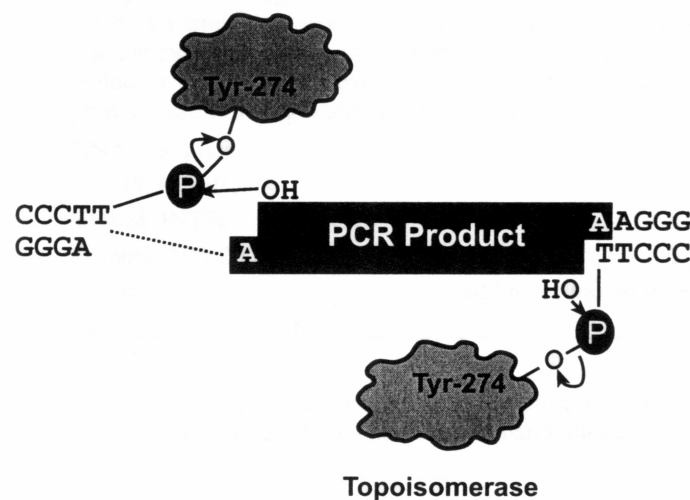


Abbildung 8 : An den Vektor gebundene (aktivierte) Topoisomerase stellt eine kovalente Bindung zwischen den komplementären Enden von Vektor und PCR-Produkt her (Quelle: Topo Cloning Instruction manual, Invitrogen).

Das so hergestellte Konstrukt wird dann mittels eines 30-sekündigen Hitzeschocks bei 42°C in kompetente *E. coli* (*E. coli* TOP10, Invitrogen) eingebracht. Da der Vektor für Ampicillinresistenz kodiert, können erfolgreich transformierte Bakterien dann auf LB-Agarplatten mit 100µg/ ml Ampicillin selektioniert werden.

### 3.2.13. Selektion positiver Kolonien

Der PCR II-Topo-Vektor ermöglicht das sog. Blue/white screening, da ein in den Vektor inseriertes DNA-Fragment den Leserahmen des auf dem Plasmid vorhandenen Gens für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase unterbricht. Bakterien, die ein Plasmid mit Insert enthalten, können daher ein Substrat dieses Enzyms (X-Gal) nicht verstoffwechseln und bleiben auf X-Gal enthaltenden Agarplatten weiß, wohingegen Bakterien, die einen leeren Vektor enthalten, ein blaues Produkt bilden.

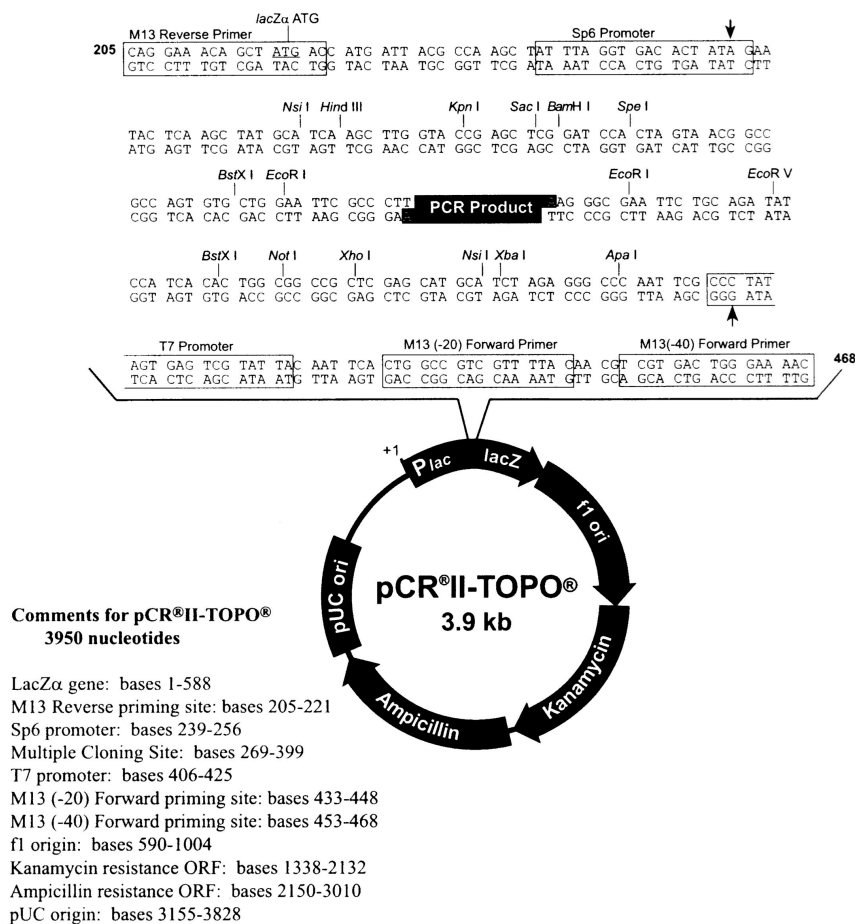


Abbildung 9: Der Vektor pCR®II-Topo (Quelle: Topo Cloning Instruction manual, Invitrogen)

Nach Inkubation über Nacht bei 37° wurden einzelne weisse Kolonien auf frische Ampicillin-Agarplatten übertragen und nochmals über Nacht bei 37° inkubiert. Von diesen Kolonien wurden dann Flüssigkulturen angelegt (5 ml LB-Medium mit 100µg/ ml Ampicillin). Aus diesen Kulturen wurde am nächsten Tag das Plasmid isoliert. Verwendet wurde hier der Qia-

Prep plasmid miniprep kit (Qiagen). Bei diesem Verfahren werden die Bakterienzellen durch alkalische Bedingungen lysiert, Protein und an der Zellwand anhaftende chromosomale DNA mit SDS präzipitiert und die im Überstand befindlichen Plasmide anschliessend über ein DNA-bindendes Silicagel-Säulchen gereinigt.

#### 3.2.14. Anlegen von Glyzerinkulturen zur dauerhaften Aufbewahrung

Ausserdem wurde jeweils 1 ml der Flüssigkultur zum Anlegen einer Glyzerinkultur verwendet. Die Bakterien wurden hierzu abzentrifugiert und in 500 µl eines 1:1-Gemisches von LB-Medium und Glycerin resuspendiert. Diese Mischung wurde in sterilen Kryoröhrchen bei  $-80^{\circ}$  eingefroren.

#### 3.2.15. Kontrolle der Insertlänge mittels PCR

Die isolierten Plasmide wurden mittels PCR auf das Vorhandensein eines Inserts der richtigen Größe überprüft. Als Primer wurden hier M13-Sequenzierungsprimer verwendet, da der Vektor entsprechende Primerbindestellen aufweist. Der PCR-Ansatz war wie folgt:

Qiagen PCR Mastermix	10 µl
M13-Primer (forward und reverse, 10 pmol/µl)	1 µl
Plasmid	1 µl
H <sub>2</sub> O	8 µl

Die PCR erfolgte über 35 Zyklen mit einer annealing-Temperatur von  $55^{\circ}$ . Die erhaltenen Produkte wurden auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt.

#### 3.2.16. Sequenzierung und Datenbanksuche

Plasmide, die ein Insert der richtigen Größe enthielten, wurden zum Sequenzieren zur Fa. MWG Biotech, Ebersberg, gesandt. Von jedem differentiell exprimierten Fragment wurden 5 Klone sequenziert, um den Erfolg der Reinigung durch das SSCP-Gel zu überprüfen. Die Mehrzahl der erhaltenen Sequenzen sollte hier identisch sein.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul *et al*, 1997) mit den in der Nucleotide Sequence Databank des Entrez Browsers des National Institute of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) gespeicherten Sequenzen verglichen.

### 3.2.17. Primerdesign und -herstellung

Für Gene, die interessant erschienen, d.h. deren Sequenz mehrfach gefunden wurde, wurden sodann mit dem Programm „DNAsis 2.5“ (Hitachi Software Engineering Co., Tokyo, Japan) geeignete PCR-Primer entworfen. Hierbei wurde darauf geachtet, daß die Primer spezifisch für das zu amplifizierende mRNA-Fragment waren und ein Produkt mit einer Größe von 300 – 400 bp ergaben. Sämtliche Primer wurden von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg, im HPSF-Verfahren (high purity salt free) synthetisiert. Die in lyophilisiertem Zustand gelieferten Primer wurden mit H<sub>2</sub>O bidest. aufgelöst und auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt.

### 3.2.18. Bestätigung der differentiellen Expression mit semiquantitativer RT-PCR

Die Bestätigung der differentiellen Expression der gefundenen Gene erfolgte mit semiquantitativer RT-PCR. Hier kam das QuantumRNA<sup>™</sup> Kit der Fa. Ambion (Austin, Texas, USA) zum Einsatz. Das Prinzip der „QuantumRNA<sup>™</sup> semiquantitative RT-PCR“ ist folgendes: Die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA wird zunächst in cDNA umgeschrieben (3.2.19). Dann wird eine Multiplex-PCR mit Primern für das zu untersuchende Gen, Primern für 18S rRNA und sog. Competimers durchgeführt (3.2.21). Competimers sind ebenfalls Primer für 18S rRNA, die allerdings so modifiziert sind, daß sie von der Taq-Polymerase nicht verlängert werden können. Indem man nun das Verhältnis von 18S-Primern und Competimers so wählt, daß die resultierende Menge an PCR-Produkt etwa der Menge entspricht, die bei derselben Zyklenzahl von der zu untersuchenden cDNA synthetisiert wird, kann man aus dem Verhältnis der Bandenstärke der beiden resultierenden Banden auf einem Gel die relative Expression des interessierenden Gens bei mehreren parallel untersuchten Proben bestimmen. Wichtig ist hierbei, die Zahl der PCR-Zyklen möglichst gering zu halten, da nur so gewährleistet ist, daß beide PCR-Reaktionen noch in der exponentiellen Vermehrungsphase sind. Dies ist essentiell für die Vergleichbarkeit.

Um das ideale Mischungsverhältnis von 18S-Primern und Competimers sowie die ideale Zyklenzahl zu finden, müssen für jedes zu untersuchende Gen Vorversuche durchgeführt werden. Da die Menge an Produkt, die nach diesen geringen Zyklenzahlen vorhanden ist, auf einem Agarosegel nicht nachweisbar ist, wurden die PCR-Produkte durch Zugabe von  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zum Reaktionsansatz radioaktiv markiert und dann nach Auftrennung auf einem Novex<sup>®</sup> PAA-Minigel (3.2.22) mit einem Phosphorimager (3.2.23) ausgewertet.

## 3.2.19. Reverse Transkription für QuantumRNA™

10x RT-Puffer (Boehringer Mannheim)	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
10 mM dNTP	2 µl
Random hexamers (Oligonukleotide, Boehringer Mannheim)	2 µl
AMV reverse Transkriptase (Promega)	0,8 µl
RNasin RNase Inhibitor (Promega)	1 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	3,2 µl
Gesamt-RNA	5 µl

Die Reagenzien wurden in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen gemischt und dann im PE 9700 Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert: 10 min annealing der random hexamers an die RNA bei 25°, 60 min Synthese der cDNA bei 42° und 15 min Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 99°. Anschliessend wurde die Reaktion mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 50 µl aufgefüllt.

## 3.2.20. Überprüfung der Qualität der cDNA

Die Qualität der erhaltenen cDNA wurde regelmässig mit dem Gene Checker Kit der Fa. Invitrogen überprüft. Dieses Kit enthält 5 Primersets für cDNAs, mit deren Hilfe es möglich ist, Aussagen über Qualität und Länge der erhaltenen Produkte zu treffen. Die Primersets amplifizieren folgende cDNAs:

β-actin (3'-Region)

β-actin (5'-Region)

Clathrin (2 kb-Region)

Clathrin (6 kb-Region)

GAPDH (3'-Region)

Wenn mit allen 5 Primerpaaren PCR-Produkte erhalten werden, kann davon ausgegangen werden, daß die verwendete cDNA größtenteils intakte Transkripte von voller Länge enthält.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

10x PCR-Puffer (PE Applied Biosystems)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	7 µl
10 mM dNTP	10 µl
Primer (200 ng/ Primer)	4 µl
cDNA	2 µl
Taq-Polymerase (PE Applied Biosystems)	1 µl

H <sub>2</sub> O bidest.	21 µl
--------------------------	-------

Die PCR erfolgte über 35 Zyklen mit einer annealing-Temperatur von 55°. Die erhaltenen Produkte wurden auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt.

### 3.2.21. QuantumRNA<sup>TM</sup> –PCR

Die folgenden Reagenzien wurden in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen gemischt:

Qiagen PCR Mastermix	10 µl
18S-Primer	abhängig vom untersuchten Gen
Competimers	abhängig vom untersuchten Gen
Genspezifische Primer (forward und reverse)	je 0,5 µl
cDNA	2 µl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mM, Amersham-Pharmacia)	0,1 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 20 µl

Die PCR wurde dann mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen abhängig vom untersuchten Gen durchgeführt.

### 3.2.22. Elektrophorese auf Novex<sup>®</sup>-Minigelen

Zur elektrophoretischen Auftrennung der erhaltenen PCR-Produkte wurden 4-20%ige Gradientenfertiggele der Fa. Novex verwendet. Die radioaktiven Produkte wurden 1:1 mit PAA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Laufzeit betrug 1h bei einer Spannung von 200 V. Anschliessend wurde die Gelkassette geöffnet, das Gel auf Whatmanpapier transferiert und auf dem Gelrockner getrocknet (s.3.2.7)

### 3.2.23. Phosphorimaging

Die Auswertung dieser Gele erfolgte mittels phosphorimaging. Hierzu wird ein sog. *phosphor storage screen* auf das getrocknete Gel aufgelegt. Die ionisierende  $\beta$ -Strahlung, die das in die PCR-Produkte inkorporierte  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP emittiert, erzeugt ein latentes Bild auf dem screen (Abbildung 10). Der screen wird dann im Phosphorimager (Storm 860, Molecular Dynamics) ausgelesen. Dabei werden die BaFBR:EU<sup>+2</sup>-Kristalle in dem screen mit einem Laser weiter angeregt, woraufhin sie Energie als blaues Licht freisetzen (2) und in den Grundzustand zurückfallen (3). Das emittierte blaue Licht wird detektiert (4) und in ein quantitatives Bild des Gels umgesetzt.

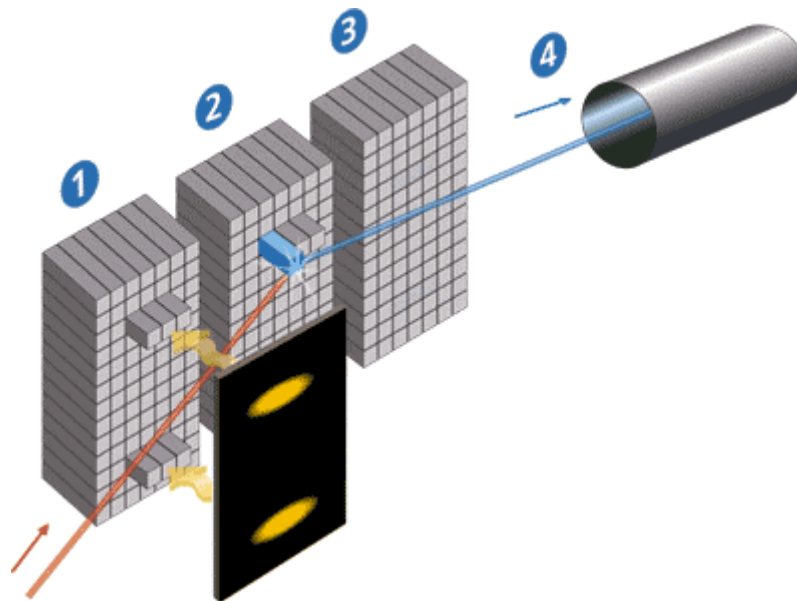


Abbildung 10: Prinzip des Phosphorimaging (Quelle: <http://www.mdyn.com/products/Storm/storagephosphor.htm>)

Das so generierte Bild kann dann mittels der ImageQuant Software (Molecular Dynamics) ausgewertet werden. Hierzu werden die einzelnen Banden ausgewählt, das Programm errechnet dann die „Schwärzung“ der Banden in counts. Dies ist eine arbiträre Einheit, die die Intensität der Photonenemission aus dem *phosphor storage screen* während des Scannens und somit indirekt die Menge an radioaktiv markiertem PCR-Produkt angibt.

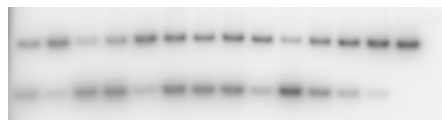


Abbildung 11: Abbild eines Quantum-Gels

Man bildet das Verhältnis der Intensitäten der genspezifischen Bande (untere Bande in Abbildung 11) und der zugehörigen 18S-Bande (obere Bande in Abbildung 11) zueinander und erhält so ein relatives Maß für die Expression des jeweiligen Gens in den verschiedenen Fibroblastenkulturen, daß in einem Balkendiagramm dargestellt werden kann.

### 3.2.24. Herstellung der Sonden für die in situ Hybridisierung

Zur Überprüfung der Expression der gefundenen mRNAs im Gewebe wurden in situ Hybridisierungen durchgeführt (3.1.7). Hierzu wurden zunächst PCR-Produkte mit denselben Primern hergestellt, die auch bei der QuantumRNA<sup>TM</sup>-Methode zum Einsatz kamen. Diese Produkte wurden sodann mittels Topo-Cloning in den PCR II-Topo-Vektor kloniert (3.2.12).

Dieser Vektor hat den Vorteil, daß er bereits Promotoren für die SP6- bzw. T7-RNA-Polymerasen enthält (Abbildung 9). Dies ermöglicht die direkte Transkription von RNA-Sonden aus dem Vektor. Jedes hier verwendete Konstrukt wurde nochmals sequenziert, um sicherzugehen, daß es die korrekte Sequenz enthält.

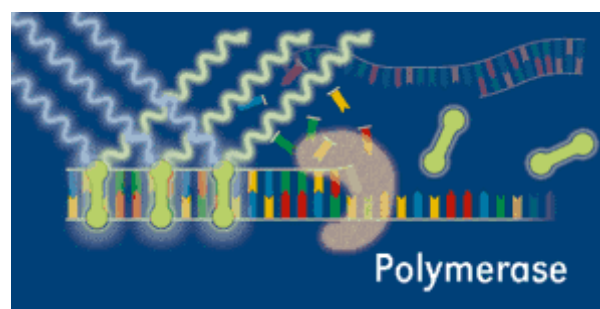
Für die Transkription erfolgte zunächst ein Restriktionsverdau des gereinigten Vektors, und zwar in getrennten Ansätzen entweder mit dem Enzym Eco RV oder BamHI. Durch diesen Verdau wurde der Vektor linearisiert, sodaß die jeweils verwendete RNA-Polymerase die Transkription am Ende des gewünschten Produktes beendet und Sonden einheitlicher Länge entstehen.

Die eigentliche Sondenherstellung (Transkription) erfolgte dann mit dem MaxiScript™ Kit der Fa. Ambion nach den Angaben des Herstellers. Die Sonden wurden durch Hinzufügen von Digoxigenin-markiertem UTP (1/3 markiertes, 2/3 unmarkiertes UTP; Boehringer Mannheim) zum Reaktionsansatz markiert. Nach der Transkription erfolgte eine Ethanol-fällung zur Konzentration der Sonden. Fertige Sonden wurden entweder sofort verwendet oder bei  $-80^{\circ}$  gelagert.

### 3.2.25. Realtime PCR mit dem LightCycler

Nachdem ab Oktober 2000 ein LightCycler (Roche) zur Verfügung stand, wurde semiquantitative RT-PCR ab diesem Zeitpunkt mit diesem Gerät durchgeführt. Die „realtime PCR“ hat erhebliche Vorteile gegenüber der bis dahin verwendeten QuantumRNA™ Methode. Sie ist genauer, einfacher zu optimieren, wesentlich schneller durchzuführen und arbeitet ohne Radioaktivität.

Die meisten Quantifizierungen wurden mit der SYBR-Green Methode ausgeführt. Diese Methode beruht darauf, daß der Farbstoff SYBRGreen in Lösung nur sehr schwach fluoresziert, seine Fluoreszenz jedoch durch Bindung an doppelsträngige DNA stark zunimmt (Abbildung 12).





*Abbildung 12: SYBRGreen fluoresziert nur, wenn es an doppelsträngige DNA gebunden ist (Quelle: [http://biochem.roche.com/lightcycler/lc\\_principles/lc\\_prin\\_dna\\_det01.htm](http://biochem.roche.com/lightcycler/lc_principles/lc_prin_dna_det01.htm))*

Während der Elongationsphase binden immer mehr Farbstoffmoleküle an die neusynthetisierte DNA. Der LightCycler misst nun die Fluoreszenz in der Kapillare (Abbildung 14), in der die Reaktion durchgeführt wird, am Ende eines jeden Elongationsschrittes und somit die Zunahme an PCR-Produkt.

Da die Fluoreszenz unabhängig von der Sequenz der DNA ist (im Gegensatz zum hybridisation probe (TaqMan) Format, 3.2.26), muss nach der PCR noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um das Vorhandensein von Primerdimeren und unspezifischen Produkten ausschliessen zu können. Hierzu wird die Probe nach Abschluss der PCR langsam (mit 0,1°C pro Sekunde) von 50°C bis auf 95°C aufgeheizt, wobei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wird. Am Schmelzpunkt (der Temperatur, bei der die beiden Einzelstränge sich voneinander trennen), der für jedes PCR-Produkt spezifisch ist und von dessen Länge und GC-Gehalt abhängt, nimmt die Fluoreszenz plötzlich stark ab, da SYBR-Green nur an doppelsträngige DNA bindet. Die LightCycler-Software zeigt auch die erste Ableitung der Schmelzkurven, dort erscheint jeder Schmelzpunkt als Scheitelpunkt einer Kurve. Zeigt die Schmelzkurve einer Probe zwei oder mehrere solche Punkte, ist vom Vorhandensein unspezifischer Produkte auszugehen, was eine Quantifizierung unmöglich macht.

Auch hier wird wieder auf die 18S-rRNA als internen Standard zurückgegriffen, allerdings werden hier die Reaktionen für das zu untersuchende Gen und die 18S-rRNA in parallelen Ansätzen durchgeführt.

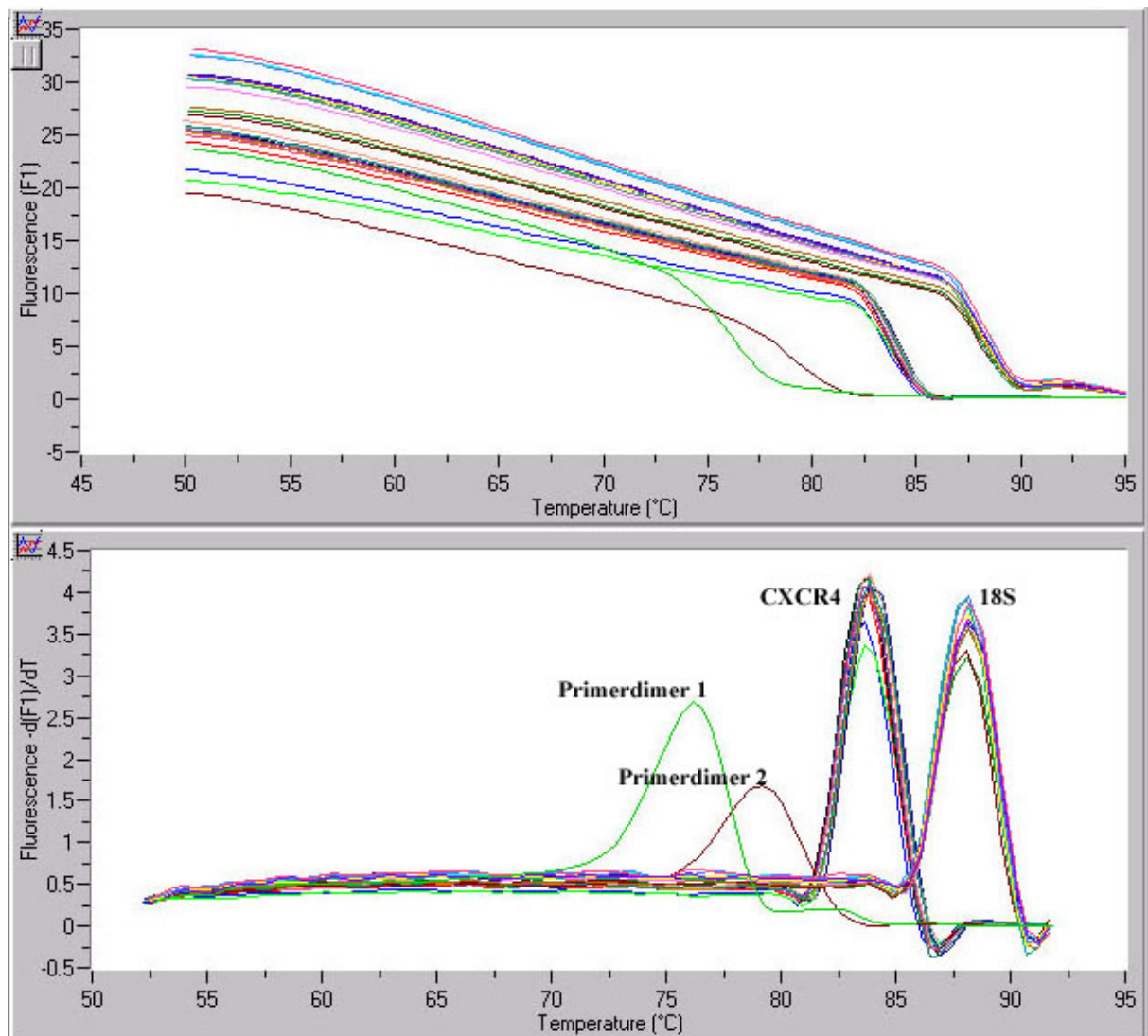


Abbildung 13: Diese Auswertung eines LightCyclerlaufs zeigt die gemessenen Schmelzkurven (oben) bzw. deren erste Ableitung (unten) für alle Proben. Die Primerdimere entstanden in den mitgeführten Negativkontrollen.

Folgender Ansatz wird pipettiert:

FastStart SYBRGreen MasterMix 10x (Roche)	2 µl
Primer (2 pmol/ µl, forward + reverse)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,6 – 3,2 µl
cDNA	2 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 20 µl

Der Ansatz wird in die LightCycler-Kapillare (Abbildung 14) pipettiert, mit Hilfe der Zentrifugenadaptoren in die Spitze der Kapillare zentrifugiert und in das LC-Karussell gesteckt. Die

PCR-Bedingungen werden nach den eingesetzten Primern gewählt. Ein typisches Profil wäre eine zehnminütige Inkubation bei 95°C zur Aktivierung des Hotstartenzym, 45 Zyklen von 2s bei 95°, 5s bei der Annealingtemperatur der gewählten Primer und ca. 20s bei 72°. Darauf folgt die Erstellung der Schmelzkurve (s.o.) durch langsames Aufheizen (0,1° pro s) von 50° auf 95°. Anschliessend werden die Produkte auf 40° abgekühlt und entnommen.



Abbildung 14: LightCyclerkapillaren mit Deckel (Quelle: [http://biochem.roche.com/lightcycler/lc\\_principles/lc\\_prin\\_dna\\_det01.htm](http://biochem.roche.com/lightcycler/lc_principles/lc_prin_dna_det01.htm))

Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler-Software und MS Excel. Die LightCycler Software erzeugt einen Graph, in dem der Logarithmus der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird (Abbildung 15). Die 2. Ableitung der Steigung dieses Graphen hat ein Maximum an dem Punkt, an der die Änderung der Fluoreszenz am grössten ist. Dies ist normalerweise an der Stelle der Fall, an der die Fluoreszenz des PCR-Produktes das erste Mal von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden kann, die PCR sich also am Beginn der logarithmischen Phase befindet. Der Zyklus, bei dem dieses Maximum liegt, der sog. crossing point (CP), wird zur Berechnung der relativen Expression der zugrundeliegenden mRNAs nach folgender Formel verwendet:

$$\frac{1}{2^{CP(Gen)-CP(Kontrolle)}} \cdot$$

Dabei steht CP (Gen) für den crossing point des untersuchten Gens, CP (Kontrolle) für den CP des verwendeten Kontrollgens (normalerweise 18S) für dieselbe cDNA. Diese relativen Expressionswerte werden dann in einem Balkendiagramm dargestellt.

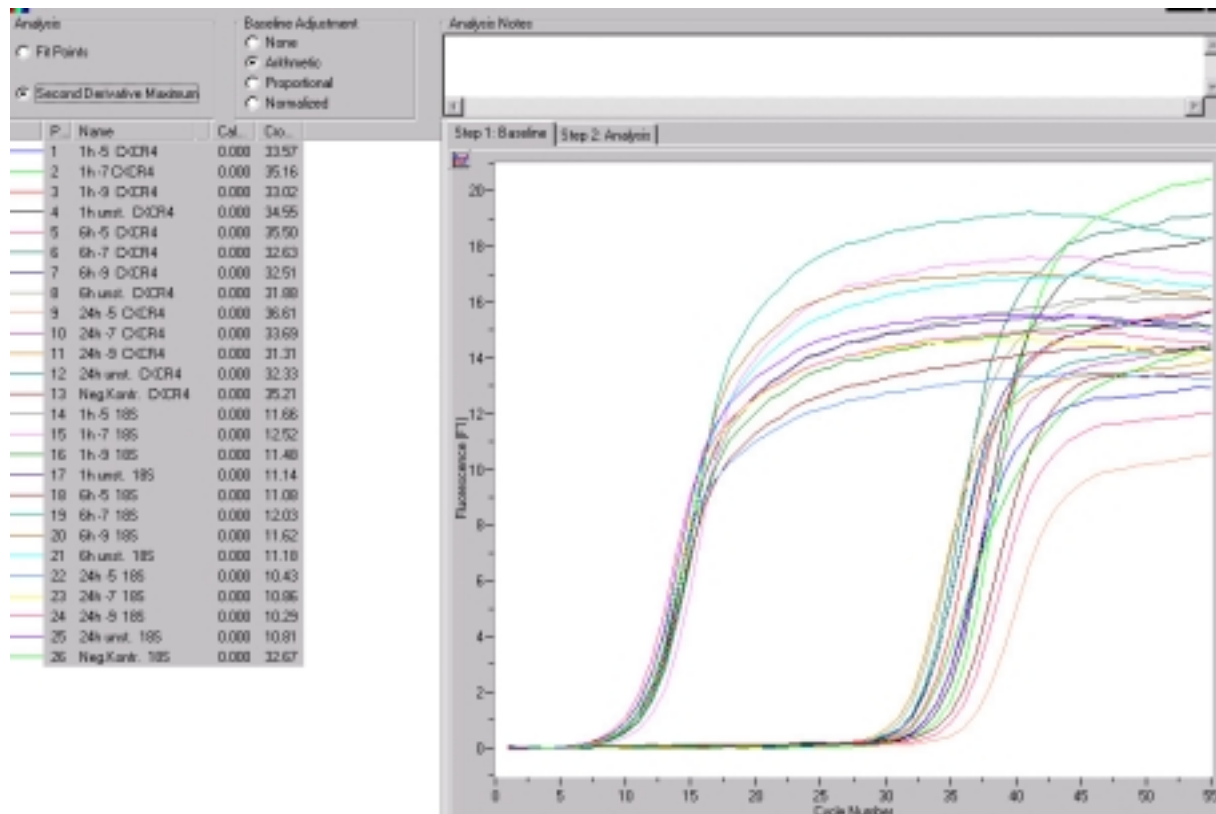


Abbildung 15: Auswertungsbildschirm der LightCycler-Software (Cro...: crossing point)

### 3.2.26. Realtime PCR mit dem TaqMan

Für SDF-1 wurden Realtime-PCR-Experimente bereits im Sommer 2000 mit einem Gene-Analyzer 7700 („TaqMan“, PE Applied Biosystems) bei Prof. Gay am Zentrum für experimentelle Rheumatologie des Universitätsspitals Zürich durchgeführt. Das Prinzip der Quantifizierung ist hier ein anderes: es wird nicht ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der an jede vorhandene doppelsträngige DNA bindet, sondern genspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden. Diese sind auf der 5'-Seite mit einem Reporter (hier: Fluorescein) und auf der 3'-Seite mit einem Quencher (hier: TAMRA) markiert. Weiterhin ist das 3'-Ende der Sonde blockiert, um eine Verlängerung durch die Taq-Polymerase zu verhindern. Solange die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher unterdrückt. Bei jedem PCR-Zyklus lagert sich nun die Sonde im Annealingschritt an das kompatible PCR-Produkt an, wird dann während des Verlängerungsschrittes am 5'-Ende von der Taq-Polymerase verdrängt und anschliessend durch deren 5'-3'-Exonukleaseaktivität abgebaut. Damit wird der Reporter frei, und es entsteht freier Fluoreszenzfarbstoff proportional zur Menge des vorhandenen PCR-Produktes (Abbildung 16). Dieses Prinzip wurde erstmals 1991 von Holland und Mitarbeitern (Holland *et al*, 1991) beschrieben.

Im Gegensatz zum SYBRGreen-Format, bei dem die Fluoreszenz bei jedem Denaturierungsschritt auf 0 zurückgeht, nimmt hier die Fluoreszenz durch freiwerdenden Reporter im Verlauf der PCR kontinuierlich zu. Eine Schmelzkurvenanalyse ist hier systembedingt weder möglich noch notwendig.

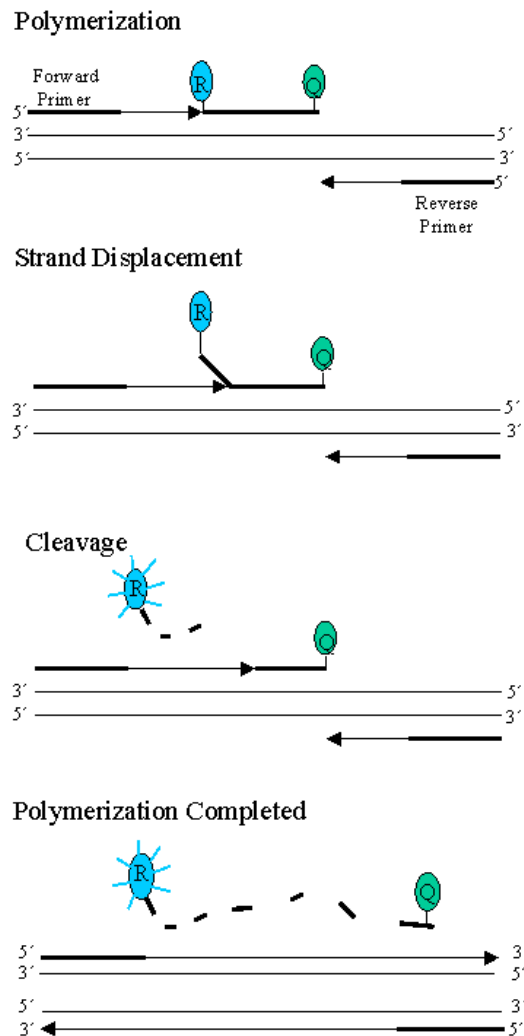


Abbildung 16: Prinzip des TaqMan-Verfahrens (Quelle: <http://www.ukl.uni-freiburg.de/core-facility/taqman/taqindex.html>; R: Reporterfarbstoff, Q: Quencher; Erklärung im Text)

Auch bei dieser Methode wurde wieder 18S-rRNA als Standard verwendet. Es wurden je 2 parallele Reaktionen mit den genspezifischen Primern sowie den 18S-Primern durchgeführt. Die Auswertung erfolgt dann ebenso wie bei dem SYBRGreen-Verfahren im LightCycler.

### 3.2.27. Steroidstimulierung synovialer Fibroblasten

Um den Einfluss von Steroiden auf die SDF1- und CXCR4-Produktion der Fibroblasten zu überprüfen, wurden diese mit verschiedenen physiologischen Konzentrationen an Prednisolon stimuliert. Eingesetzt wurden  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-9}$  M Prednisolon in normalem Kulturmedium

(DMEM mit 10% FCS), die Zellen wurden nach 1, 6 und 24 Stunden geerntet. Die RNA-Isolierung erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben, die reverse Transkription wurde nach 3.2.19 durchgeführt. Für die realtime-PCR im LightCycler wurden die Primer SDF neu sowie CXCR4 verwendet (s.2.2).

### 3.2.28. MOMeNT

Um Unterschiede in der Genexpression zwischen der hyperplastischen synovialen Deckzellschicht und den darunterliegenden Anteilen des Synoviums zu identifizieren, wurde die sog. MOMeNT-Methode (Microbeam microdissection of membrane-mounted native tissue) verwendet. Dieses Verfahren gestattet es, aus Kryoschnitten unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Lasers Areale auszuschneiden und diese in den Deckel eines sterilen Reaktionsgefäßes zu überführen (Abbildung 17). Da das Laserschneiden eine Kaltablation durch Photolyse chemischer Bindungen darstellt, die ohne Hitzeentwicklung abläuft, wird umliegendes Gewebe nicht geschädigt. Ebenso bleibt die RNA intakt, sodaß sie für die RAP-PCR eingesetzt werden kann.

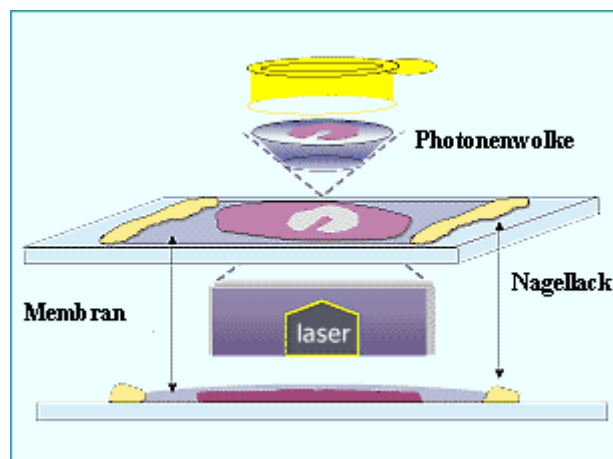


Abbildung 17: MOMeNT-Prinzip (nach [http://www.palm-mikrolaser.com/about\\_us\\_technology\\_lpc\\_slides.html](http://www.palm-mikrolaser.com/about_us_technology_lpc_slides.html))

Hierzu wurden Gefrierschnitte (5-8  $\mu\text{m}$ ) auf einen Objektträger aufgebracht, der mit einer 1,35  $\mu\text{m}$  dünnen Polyethylenmembran überzogen wurde (Bohm *et al*, 1997) (PEN-Membran, P.A.L.M., Wolfratshausen). Um die Schnitte besser haften zu lassen, war die Membran zuvor mit Nagellack auf dem Objektträger befestigt und mit Poly-L-Lysin beschichtet worden (0.2% Poly-L-Lysin in sterilem, DEPC-behandeltem  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.). Anschliessend wurden die Schnitte mit einer Mischung aus 5% Eisessig und 95% Ethanol fixiert, getrocknet, in einer RNase-freien HE-Färbereihe gefärbt und wiederum getrocknet. Das gewünschte Areal wurde mit dem fokussierten Laserstrahl ausgeschnitten, dann wurde mit defokussiertem Strahl ein

kurzer Puls gegeben. Die hierbei entstehende Photonenwolke katapultiert den Ausschnitt in den darüber angebrachten Deckel eines normalen sterilen Eppendorfreaktionsgefäßes (daher auch die Bezeichnung LPC: Laser pressure catapulting), das mit 3 µl Mineralöl gefüllt ist. Die nur leicht am Objektträger haftende Membran ermöglicht es hierbei, daß der gesamte Ausschnitt in einem Stück gewonnen werden kann.

### 3.2.29. RNA-Isolierung aus Laserproben

Der Deckel wurde sofort auf das mit 300 µl RLT-Lysepuffer (RNeasy spin column purification kit; Qiagen) gefüllte Reaktionsgefäß gesetzt und der Ausschnitt durch Mischen mit dem Puffer lysiert. Die RNA wurde dann ebenso wie unter 3.2.1 beschrieben isoliert.

### 3.2.30. RAP-PCR aus MOMeNT-Proben

Die RAP-PCR wurde durchgeführt wie unter 3.2.3 und 3.2.5 beschrieben, allerdings wurde die PCR-Amplifikation hier aufgrund der geringen Ausgangsmenge an RNA in zwei Stufen durchgeführt. Als Primer für die reverse Transkription kam OPN23 bzw. US6 zum Einsatz, anschliessend wurde die entstandene cDNA durch eine Ethanolfällung aufgereinigt und in 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert. Für die Amplifikation wurden im ersten Schritt die gesamten 30 µl cDNA zusammen mit dem Primer OPN21 verwendet. Es wurden lediglich 15 Zyklen durchgeführt, dann wurde das Produkt wiederum gefällt und nochmals in 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert. 10 µl von diesem gereinigten PCR-Produkt wurden sodann in eine zweite PCR (Primer: OPN21 nested) eingesetzt und für weitere 35 Zyklen amplifiziert. Die verwendeten Reagenzien und PCR-Bedingungen waren dieselben wie unter 3.2.3 und 3.2.5 beschrieben.

Jede Reaktion wurde in 2 parallelen Ansätzen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit und Stabilität des Fingerprints zu testen. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß ein stabiler Fingerprint ein Gewebestück erfordert, das etwa 600 Zellen enthält. Daher wurde in allen späteren Versuchen diese Menge eingesetzt. Stabiler Fingerprint bedeutet hier, daß ein reproduzierbares Muster von etwa 100 – 150 Banden entsteht, deren Größe im Bereich von 100 bis etwa 600 bp liegt.

### 3.2.31. Aufreinigung differentiell exprimierter Sequenzen

Banden, die differentiell exprimiert erschienen, wurden wiederum aus dem Gel ausgeschnitten wie in 3.2.8 beschrieben, reamplifiziert (3.2.9), über ein SSCP-Gel gereinigt (3.2.10), nochmals reamplifiziert und kloniert (3.2.11, 3.2.5, 3.2.12). Die durch Sequenzierung von je 5 Klonen pro ausgeschnittener Bande (3.2.16) erhaltenen Sequenzabschnitte wurden mit dem BLAST-Tool (Altschul *et al*, 1997) mit den in der Genbank gespeicherten Daten verglichen

(3.2.16). Auf diesem Wege konnten die Banden auf dem PAA-Gel bestimmten Genen zugeordnet werden.

### 3.3. RAP-PCR-Mikroarrays

Ziel dieses Projektes war es, basierend auf vorhandenen Techniken (RAP-PCR) und mit vorhandenen Proben eine Methode zu entwickeln, mit der viele Proben (mehrere hundert) auf die Expression einer grösseren Anzahl von Genen (hundert oder mehr) untersucht werden können. Dies ist mit etablierten Methoden wie realtime PCR oder cDNA Arrays aufgrund der damit verbundenen Kosten nicht möglich. Da am Sidney Kimmel Cancer Center (SKCC) in San Diego, CA bei Prof. Michael McClelland und Prof. John Welsh zum einen die RAP-PCR entwickelt wurde, zum anderen auch alle Voraussetzungen zur Herstellung von Mikroarrays gegeben waren, wurde dieser Teil der Arbeit dort durchgeführt. Dieses Projekt wurde von BaCaTec (Bavaria California Technology Center; Bayerisch-Kalifornisches Hochschulzentrum) gefördert.

#### 3.3.1. Herstellung der RAP-PCRs

Für dieses Projekt wurden RNAs von 23 Patienten (17 RA, 3 OA und 3 Normalsynovium) in 2 Konzentrationen (100 und 200 ng) eingesetzt. Die reverse Transkription wurde wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt. Für die PCR wurde die Ansatzgrösse im Vergleich zu 3.2.5 verdoppelt, die Durchführung war identisch, allerdings wurde kein radioaktives dCTP verwendet. Folgende Primerkombinationen kamen zum Einsatz:

RT	PCR
Kinase A 2+	US6
Kozak 1+	OPN 23
Hurra 1	WB 1
Hurra 2	WB 2
Kinase A-	Nuclear 1+
Kinase A 1+	OPN 21
TYRP 1+	Kinase A 1+
US 9	Nuclear 2+
Nuclear 2+	US 9
OPN 21	Hurra 1
MJ 2	OPN 24



MJ3	Kozak 1+
OPN 29	Kinase A-
US 6	MJ2
OPN 24	BR 1
OPN 25	TYRP 1+
Nuclear 1+	WB 1
Nuclear 1-	Kinase A-
WB 2	WB 4
MJ 4	Nuclear 2-

Anschliessend wurden die PCR-Produkte mit dem Qiagen 96 well PCR purification kit aufgereinigt und in 50  $\mu$ l Tris pH 8.5 (10mM) eluiert, um Primer und Salze zu entfernen. Zur Überprüfung der Qualität der Fingerprints wurden je Reaktion 5  $\mu$ l entnommen und radioaktiv endmarkiert. Folgender Ansatz wurde verwendet:

PNK Puffer (New England Biolabs)	0,6 $\mu$ l
$\gamma^{32}$ P-ATP (3000 Ci/mM, Amersham-Pharmacia)	0,2 $\mu$ l
T4-Polynukleotidkinase	0,2 $\mu$ l
PCR-Produkt	5 $\mu$ l

Die Reaktionen wurden für 30 min bei 37°C inkubiert, sodann mit 4  $\mu$ l Auftragspuffer versetzt, hitzedenaturiert und auf einem PAA-Gel aufgetrennt (3.2.7). Dieser Teil des Projektes wurde in Regensburg durchgeführt, die restlichen ca. 40  $\mu$ l der so überprüften PCR-Reaktionen wurden dann nach San Diego transportiert.

Dort mussten zunächst die optimalen Bedingungen für das Aufbringen der RAP-PCRs auf den Objektträger gefunden werden. Hierfür wurde ein OmniGrid-Roboter der Firma Gene Machines (San Carlos, CA) verwendet. Es zeigte sich, dass die Verdünnung der Proben in DMSO (1:1) in Verbindung mit dem Aufbringen auf CMT-GAPS Objektträger (Corning, Corning, NY) die besten Ergebnisse in Bezug auf Homogenität der spots ergab. Corning CMT-GAPS Objektträger tragen auf ihrer Oberfläche freie Amingruppen, dies ermöglicht eine Ionenbindung der negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates. Zur kovalenten Verknüpfung der PCR-Produkte an das aminosilan-beschichtete Glas wurden die Arrays anschliessend nach Trocknung bei Raumtemperatur für 2h bei 80°C gebacken.

Auch Umgebungsbedingungen wie Luftfeuchtigkeit und –temperatur beeinflussen die Qualität eines Mikroarrays stark. Ideal wäre hier eine Temperatur von 22°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45% (Wildsmith & Elcock, 2001).

Um die ungefähre DNA-Konzentration der einzelnen Proben zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen einer DNA bekannter Konzentration zusammen mit den RAP-PCR-Reaktionen auf einen Objektträger gespottet. Dieser wurde dann durch 15-minütiges Schütteln in 1x SYBGreen II bei Raumtemperatur gefärbt (Battaglia *et al*, 2000). Es folgten 2 fünfminütige Waschschrte in H<sub>2</sub>O bidest. im dunkeln.

Die Auswertung dieser Färbung und auch der später folgenden Hybridisierungen erfolgte mit einem ScanArray 5000 der Firma GSI Lumonics (Packard Biochip Technologies, Billerica, MA). Zum Scannen wurde die Software ScanArray, zur Auswertung der Ergebnisse die Software QuantArray verwendet, beide ebenfalls von GSI Lumonics.

Die Auswertung der SYBRGreen-Färbung ergab, daß die DNA-Konzentration vieler Proben sehr gering war (unter 10 ng/ µl). Um die Konzentration zu erhöhen wurden alle Proben offen in einem Thermocycler getrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O bidest. wieder aufgenommen. 5 µl hiervon wurden in 384-well-Platten mit 5 µl DMSO versetzt und zur Herstellung aller folgenden Arrays verwendet.

### 3.3.2. Herstellung der Sonden

Zur Herstellung genspezifischer Sonden wurden IMAGE-Klone verwendet. Diese wurden z.T. von Dr. Takuya Higashiyama aus Prof. Welshs Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, z.T. von der Firma Research Genetics erworben. Nähere Informationen zu den Klonen finden sich im Anhang.

Zunächst wurden alle Bakterienkulturen auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen, dann aus Einzelkolonien Flüssigkulturen angelegt und aus diesen die Plasmide isoliert wie unter 3.2.13 beschrieben. Aus diesen Plasmiden wurde dann mittels PCR (Primer: M13; s. 3.2.15) das jeweilige Insert amplifiziert.

Diese PCR-Produkte wurden zusammen mit den RAP-PCR-Proben und weiteren Kontrollen (4 bakterielle ORFs, zur Verfügung gestellt von Dr. Steffen Porwollik, sowie 50% DMSO) auf Corning CMT-GAPS Objektträger gespottet. Die Arrays wurden wiederum wie oben beschrieben gebacken und anschliessend zur Entfernung des auskristallisierten Tris in H<sub>2</sub>O bidest. sowie in 95%igem Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet.

Da bekannt ist, daß IMAGE-Klone nicht immer die cDNA enthalten, die sie enthalten sollten, wurden alle Klone auch sequenziert. Hierzu wurde ein Licor 4200L Sequencer zusammen mit dem ABI PRISM® Big Dye™ Terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems) nach

Angaben des Herstellers verwendet. Es zeigte sich, daß 2 Klone nicht die erwartete Sequenz enthielten. Für 2 weitere Klone konnte keine lesbare Sequenz erhalten werden .

Die aus den IMAGE-Klonen erzeugten PCR-Produkte wurden nun mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

Random-hexamer Oligonukleotide 2 µg/µl	6 µl
PCR-Produkt 100 ng/µl	10 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	4 µl

Diese Mischung wurde für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Dann wurden folgende Reagenzien zugegeben:

10x Pol-Puffer (NEB)	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl
Cy3- bzw. Cy5-dCTP (Amersham)	1,5 µl
Klenow-Fragment (NEB, 5 U/µl)	4 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	14,5 µl

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl EDTA 0,5 M abgestoppt und mittels des Qiagen PCR purification kits aufgereinigt. Die Sonden wurden in 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. eluiert, im Vakuumkonzentrator auf 5 µl Volumen reduziert und für die Hybridisierung mit den Arrays verwendet.

### 3.3.3. Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde nach den Vorgaben von Corning durchgeführt, folgendes Protokoll wurde verwendet:

Cy3-markierte Probe	5 µl
Cy5-markierte Probe	5 µl
Blocking mix	3,5 µl
SDS 10%	0,6 µl
SSC 20x	15 µl
Formamid	30 µl

(blocking mix: je 1 µl Hefe-tRNA (0,5 µg/µl) und Cot 1-DNA (10 µg/µl) sowie 1,5 µl Oligo-dA (0,5 µg/µl))

Die Hybridisierungslösung wurde 5 Minuten bei 95°C denaturiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und auf den Array gegeben. Der mit einem Deckgläschen bedeckte Array wurde dann über Nacht bei 42°C in einer Hybridisierungskammer (Clontech, Palo Alto, CA) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Array zunächst in 42°C warmem 2x SSC, 0,1% SDS bewegt, bis das Deckgläschen abschwamm, und dann in dieser Lösung 5 min gewaschen. Es folgten weitere Waschschrte bei Raumtemperatur, zunächst für 10 min in 0,1x SSC, 0,1% SDS, dann 4x für je 1 min in 0,1x SSC. Anschliessend wurde der Objektträger bei 1000 Upm für 5 min zentrifugiert und im ScanArray 5000 gescannt.

Die ersten Hybridisierungen mit DNA-Sonden ergaben zwar ein gutes Signal für die ebenfalls auf dem Array gespotteten PCR-Produkte aus den IMAGE-Klonen (Positivkontrollen), jedoch nicht für die RAP-PCR-Produkte. Ein möglicher Grund hierfür ist die sehr geringe Komplexität der Sonde (nur ein einziges DNA-Fragment) im Gegensatz zu den sonst verwendeten komplexen cDNA-Sonden. Dies ermöglicht eine sehr schnelle Rehybridisierung der beiden Einzelstränge miteinander, was dazu führt, daß nur noch sehr wenig einzelsträngige DNA-Sonde vorliegt, um mit den RAP-PCR-Produkten zu hybridisieren.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde in der Folge auf einzelsträngige RNA-Sonden ausgewichen.

#### 3.3.4. Herstellung der RNA-Sonden

Da die IMAGE-Klone alle in Vektoren geklont wurden, die bereits Promotoren für RNA-Polymerasen enthalten, war die Herstellung von RNA-Sonden gut zu bewerkstelligen. Zunächst wurden die Plasmide mit den jeweils geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert (s. Tab. 2), dann wurde die Transkription mittels T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Hierbei wurde auch fluoreszenzfarbstoffmarkiertes UTP in die Sonden eingebaut.

<b>Vector</b>	<b>Enzym</b>
pBluescript SK-	BamHI
pT7T3-Pac	HindIII
pCMV-SPORT6	EcoRI
LafmBA	EcoRI

*Tabelle 3: Zur Linearisierung der Plasmide verwendete Restriktionsenzyme*

Verwendet wurde hierzu das MaxiScript kit der Firma Ambion (Austin, TX) nach den Angaben des Herstellers. Als Matrize diente 1 µg linearisiertes Plasmid. Je 1 µl CTP, ATP und GTP sowie 0,5 µl unmarkiertes UTP und 2 µl Cy-dye-markiertes UTP (FluoroLink, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) wurden verwendet. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C, dann wurde 1 µl RNase-freie DNase zugegeben, um das Plasmid zu entfernen. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5M EDTA beendet, die RNA-Sonde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 60 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Dabei wurde immer darauf geachtet, die Sonde soweit wie möglich vor Licht zu schützen, da Cyaninfarbstoffe lichtempfindlich sind.

Die Bestimmung der Ausbeute und der Inkorporationsrate erfolgte im Spektrophotometer. Gemessen wurde bei 260 nm (RNA), 550 nm (Cy3) und 650 nm (Cy5). Die Ausbeute an RNA wurde nach folgender Formel berechnet:  $\text{Absorption}_{260 \text{ nm}} * 0,04 = \text{RNA-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Menge an inkorporiertem Farbstoff wurde wie folgt berechnet:  $\text{Absorption}_{550 \text{ nm}}$  bzw.  $\text{Absorption}_{650 \text{ nm}} * \text{Gesamtvolumen der Probe geteilt durch } 0,15$  ergibt die Farbstoffmenge in pmol.

Sonden mit einer Inkorporationsrate von mindestens 80 pmol Fluoreszenzfarbstoff pro µg RNA wurden für die Hybridisierung verwendet. Es wurden pro Hybridisierung 200 ng bis 6 µg RNA eingesetzt, eine Menge von 1 µg RNA ergab die besten Ergebnisse.

Die Sonden wurden wiederum wie unter 3.3.2 beschrieben konzentriert und verwendet.

Die Hybridisierungen ergaben gute Signale sowohl von den gespotteten Positivkontrollen als auch von RAP-PCR-Produkten. Allerdings gaben die meisten Positivkontrollen Signale, was wohl durch die sowohl in den PCR-Produkten als auch in den RNA-Sonden enthaltenen Vektorsequenzen bedingt wurde. Zur Entfernung dieser Vektorsequenzen wurden alle als Kontrollen verwendeten PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen geschnitten, die jeweils ursprünglich zur Herstellung der IMAGE-Klone verwendet worden waren (Tab. 3). Anschließend wurden sie auf ein Agarosegel geladen, die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Qiagen gel extraction kit nach Angaben des Herstellers eluiert. Die so behandelten PCR-Produkte wurden wiederum als Kontrollen mitgespottet.

Vektor	Enzyme
pBluescript SK-	Eco RI / XhoI
pT7T3-Pac	Not I / Eco RI
pCMV-SPORT6	NotI / Sal I
LafmBA	NotI / HindIII

*Tabelle 4: Zur Entfernung der Vektorsequenzen verwendete Restriktionsenzyme*

### 3.4. P53-Mutationsanalysen

#### 3.4.1. DNA-Isolierung

Da hier das Genom der Fibroblasten auf eventuell vorhandene Mutationen untersucht werden sollte, wurde aus den kultivierten Zellen zunächst mit Hilfe des QiaAmp tissue kits (Qiagen) DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert.

#### 3.4.2. SSCP-Gelelektrophorese

Wie oben beschrieben (3.2.10), erlauben SSCP-Gele die Auftrennung von DNA-Einzelsträngen nach ihrer Konformation. Wenn ein DNA-Fragment eine Mutation aufweist, nehmen die Einzelstränge im Gel eine andere Konformation ein als die Wildtyp-DNA (wt) und zeigen damit auch ein anderes Laufverhalten.

Hier wurde die DNA von 10 RA-Fibroblastenkulturen verwendet sowie als Positivkontrolle die DNA von SW480 (Mancuso *et al*, 1997)- und SW620 (Spitz *et al*, 1996)-Zellen. Dies sind Kolonkarzinomzelllinien mit bekannten Mutationen im p53-Gen.

Zunächst wurden die einzelnen Exons des p53-Gens mittels PCR amplifiziert. Folgender Ansatz wurde verwendet:

10x PCR Puffer (Perkin Elmer)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8 µl
dNTP-Mix (10mM)	5 µl
α <sup>32</sup> P-dCTP (3000 Ci/mM, Amersham-Pharmacia)	0,2 µl
Primer (forward und reverse)	je 1 µl
DNA	5 µl
AmpliTaq (Perkin-Elmer)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 µl

Die verwendeten Primer stammen aus dem p53 amplimer panel der Firma Clontech. Die DNA wurde für 40 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 55°C amplifiziert.

Anschliessend wurden 4 µl der PCR-Reaktion mit 18 µl SSCP-Auftragspuffer vermischt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte dann wie unter 3.2.10 beschrieben über Nacht.

#### 3.4.3. NIRCA (nonisotopic RNase cleavage assay)

NIRCA ist eine nichtradioaktive Methode zur Detektion von Mutationen. Es werden die jeweils interessierenden DNA-Fragmente mit PCR amplifiziert, in einer 2. ("nested") PCR-Reaktion werden sodann Promotoren für RNA-Polymerasen angefügt. Mit Hilfe dieser Pro-

motoren und der zugehörigen Polymerasen können RNA-Kopien der jeweiligen Produkte generiert werden. Nun wird jeweils ein RNA-Strang der zu untersuchenden Probe mit dem komplementären Strang einer Wildtypkontrolle hybridisiert. Darauf folgt ein Verdau dieser doppelsträngigen RNAs mit RNase 1 und RNase A. Diese Enzyme können einzelsträngige, nicht aber doppelsträngige RNA schneiden. Ist nun der Probenstrang vollständig komplementär zur eingesetzten Wildtyp-RNA, ist dieses Hybrid resistent gegen den RNase-Verdau. Wenn aber die Probe eine Mutation enthält, können die beiden RNA-Stränge nicht vollständig paaren, die entstehende “mismatch”-Stelle kann von den RNAsen geschnitten werden. Bei einer anschliessenden Auftrennung der Produkte auf einem Agarosegel zeigen sich somit, im Gegensatz zur wt-Kontrolle, mehrere Banden.

Es wurde das MisMatch Detect II Kit zusammen mit dem p53 genomic DNA screening module verwendet (Ambion, TX). Die PCR-Ansätze waren jeweils wie folgt:

10x PCR-Puffer II (PE)	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	8 µl
Primer (forward und reverse, 10 pmol/µl)	je 1,25 µl
dNTP-Mix (10 mM)	4 µl
DNA	5 µl
H <sub>2</sub> O	25,1 µl
AmpliTaQ-Polymerase (PE)	0,4 µl

Um die Exons 5 und 6 zu amplifizieren, wurden die Primer 1S und 1 AS (2.2) verwendet, für die Exons 7-9 die Primer 2S und 3 AS. Die PCR erfolgte jeweils über 30 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 55°C. Im 2. PCR-Schritt wurden die RNA-Polymerasen-Promotoren mit folgenden Primern angefügt: für Exon 5 und 6 die Primer T7#1 und SP6#1, für die Exons 7 – 9 die Primer T7#2 und SP6#3.

Die so erhaltenen Konstrukte wurden in getrennten Ansätzen in einzelsträngige RNA überscriben. Hierzu wurden 2 µl des erhaltenen PCR-Produktes mit 1 µl 10x Puffer, 2 µl 2,5 mM rNTP-Mix, 4 µl H<sub>2</sub>O bidest. und 1 µl der jeweiligen Polymerase (T7 bzw. SP6) vermischt und 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschliessend wurden 5 µl Hybridisierungspuffer zugegeben, jeweils ein wt-Strang mit dem komplementären zu untersuchenden Strang gemischt und diese Reaktion für 5 – 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Bei der nun folgenden langsamen Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Hybridisierung der komplementären RNA-Stränge. Aufgrund der hohen Konzentration und der geringen Komplexität der Mischung erfolgt diese sehr schnell.

Die so erhaltenen RNA-Doppelstränge wurden nun für 45 min bei 37°C mit RNase 1 und RNase A verdaut. Die erhaltenen Produkte wurden dann auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Da sich RNA mit Ethidiumbromid schlecht anfärbt, wurde hier SYBRGreen II (Molecular Probes) als Farbstoff zugesetzt.

Als Kontrollen wurde die vom Hersteller mitgelieferte Wildtyp-DNA sowie, ebenso wie bei den SSCP-Versuchen, DNA aus den Kolonkarzinomzelllinien SW480 und SW620 verwendet.

#### 3.4.4. BESS T-Scan

Das “BESS (base excision sequence scanning ) T-Scan “-System (Hawkins & Hoffman, 1997) der Firma Epicentre Technologies ist ein weiteres auf PCR basierendes Verfahren zur Detektion von Mutationen. Hier werden während der Amplifikation limitierende Mengen an dUTP in das PCR-Produkt eingebaut (der verwendete Nukleotidmix enthält 200 µM dUTP zusätzlich zu 10 mM dNTP). Die anschliessende Behandlung der Produkte mit dem zugehörigen “excision enzyme mix”, der Uracil-*N*-Glykosylase enthält, entfernt die Uracilbase vom Nukleotid und erzeugt so eine abasische Stelle. Die ebenfalls im Mix enthaltene Endonuclease IV schneidet an dieser Stelle das Phosphodiester-Rückgrat der DNA. So entsteht bei der anschliessenden Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel eine Leiter, die der T-Leiter bei einer Sequenzierungsreaktion gleicht. Die Banden werden über mittels T4-Polynucleotidkinase radioaktiv markierte Primer sichtbar gemacht. Das Auftauchen oder Verschwinden einer Bande im Vergleich zu einer Kontrolle zeigt hier Mutationen an. Im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Methoden können hier systembedingt keine G → C oder C→G-Mutationen detektiert werden. Diese Punktmutationen haben allerdings an allen bekannten Mutationen lediglich einen Anteil von ca. 10%.

##### 3.4.4.1. Versuchsdurchführung:

Zunächst wurden die verwendeten Primer radioaktiv endmarkiert. Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

10x T4-PNK-Puffer	5 µl
Primer (10 pmol/ µl)	5 µl
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (3000 Ci/mmol)	2 µl
T4-Polynukleotidkinase (PNK, 1 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	37 µl



Die Reaktion wurde 30 min bei 37°C inkubiert, dann wurde die T4-Polynukleotidkinase für 5 min bei 70°C inaktiviert. Die PCR wurde anschliessend wie folgt durchgeführt:

10x PCR Puffer	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	8 µl
BESS T-Scan dNTP Mix (mit dUTP)	4 µl
Primer 1 (radioaktiv markiert)	1 µl
Primer 2 (unmarkiert)	2 µl
Taq Polymerase (1U / µl)	1 µl
PCR Enhancer	15 µl
DNA	5 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	9 µl

,wobei die Primerkombinationen PU4 (markiert) / PD7 und PU7 (markiert) / PD10 zum Einsatz kamen. Damit werden die Exons 4-7 bzw. 7-10 des p53-Gens amplifiziert. Die Primer stammen aus dem p53 amplimer panel der Firma Clontech, das auch schon für die SSCP-Versuche eingesetzt wurde. Die Amplifikation erfolgte für 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 55°C.

Die PCR-Produkte wurden für 30 min mit dem excision mix verdaut (1 µl 10x excision enzyme buffer, 5 µl PCR-Produkt, 0,5 µl excision mix, 3,5 µl H<sub>2</sub>O bidest.). Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl stop/ loading solution (Bromphenolblau/ Xylencyanol in 95% Formamid) beendet. Die Proben wurden für 5 min bei 75°C inkubiert und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (s. 3.2.7) aufgetrennt.

Das Gel wurde anschliessend getrocknet und für bis zu 2 Wochen auf einem Kodak BioMax<sup>®</sup> Film exponiert.

#### 3.4.5. Direktsequenzierung

Zusätzlich wurden die Exons 6-9 von 10 und die Exons 2-4 und 10 von 8 RA-Patienten mit PCR amplifiziert, in den Vektor PCR II Topo kloniert (3.2.12 - 3.2.16) und an die Firma SeqLab (Göttingen) zur Sequenzierung eingesandt. Auch hier wurden zur Amplifikation wieder die Primer aus dem p53 amplimer panel verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zellkultur

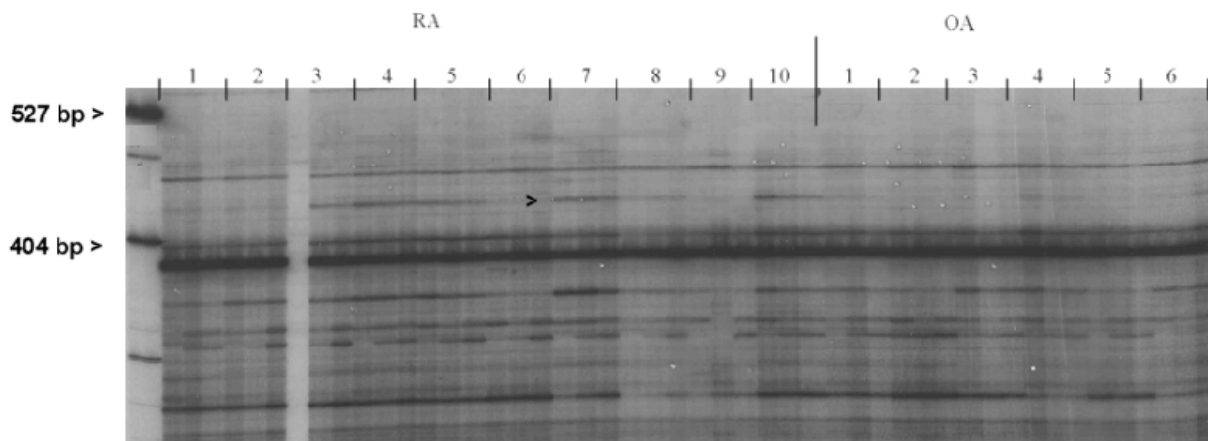
Zunächst wurde die Kultur synovialer Fibroblasten aus operativ gewonnenem Synovium etabliert. Das ein- bis zweimal pro Woche aus der orthopädischen Klinik in Bad Abbach erhaltene Gewebe wurde enzymatisch aufbereitet, sodann wurden die Fibroblasten über 2 Passagen (ca. 2 Wochen) kultiviert, um kurzlebige makrophagenartige Zellen aus der Kultur zu entfernen. Die so aus RA-Gewebe kultivierten Zellen zeigten die typische stellate Morphologie mit mehreren feinen Fortsätzen, wie sie für synoviale Fibroblasten aus RA-Gewebe (RA-SF) beschrieben wird (z.B. (Gulko *et al*, 2000)).

Die eine Hälfte der so gewonnenen Zellen wurde portioniert und für eine spätere Rekultivierung in flüssigem Stickstoff gelagert, die andere Hälfte wurde für eine Passage weiterkultiviert und anschliessend zur Isolierung von RNA verwendet. Die mit Hilfe des RNeasy-Kits erhaltene RNA wurde in RNase-freiem H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen und bis zu ihrer Verwendung bei –80°C gelagert.

### 4.2. RAP-PCR

#### 4.2.1. Etablierung der RAP-PCR

Für die RAP-PCR wurde jeweils RNA von 10 verschiedenen RA- und 6 verschiedenen OA-Patienten verwendet, wobei von jeder RNA 3 verschiedene Konzentrationen (500, 250 und 125 ng) in der RT eingesetzt wurden, um die Detektion von lediglich konzentrationsbedingten Unterschieden auszuschliessen. Somit konnte die Kapazität des Gels (50 Taschen) optimal genutzt werden.



*Abbildung 18: Ausschnitt eines RAP-PCR-Gels, links der Größenstandard, dann folgen PCR-Produkte von 10 RA- und 6 OA-Patienten wie im Text beschrieben. Der Pfeil weist auf ein differentiell exprimiertes Produkt.*

Es zeigte sich zunächst, daß die Unterschiede in der Genexpression zwischen synovialen Fibroblasten aus RA- und OA-Gewebe, die hier detektiert werden sollten, nur sehr gering waren. Lediglich sehr wenige, z.T sogar keine von den ca. 100 – 150 pro Gel erhaltenen Banden, je nach verwendeter Primerkombination, waren durchgehend oder auch nur grösstenteils bei einer Patientengruppe, nicht aber bei der anderen, exprimiert. Banden, die bei den beiden Gruppen nur mässig unterschiedlich erschienen, wurden nicht weiter bearbeitet, da davon auszugehen war, daß so identifizierte Gene nur leicht unterschiedlich exprimiert wären, was eine Beteiligung an der Pathophysiologie der RA unwahrscheinlich erscheinen liess.

Die wenigen Banden, die deutliche Unterschiede in der Expression der zugehörigen mRNAs erwarten liessen, wurden nach dem in 3.2.8 gezeigten Schema ausgeschnitten, eluiert und reamplifiziert.

#### 4.2.2. SSCP

Da aufgrund der grossen Zahl der bei der RAP-PCR entstehenden PCR-Produkte jedes ausgeschnittene Gelfragment meist mehrere verschiedene Produkte ähnlicher Grösse enthält (Mathieu-Daude *et al*, 1996b), ist eine weitere Aufreinigung notwendig. Diese erfolgte über single stranded conformation polymorphism (SSCP)-Gele (s. 3.2.10). Da in diesen nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelen DNA-Einzelstränge sequenzabhängige Sekundärstrukturen einnehmen können, die ihr Laufverhalten im Gel beeinflussen, lassen sich Fragmente gleicher Grösse, aber unterschiedlicher Sequenz gut auftrennen.

Es wurden jeweils die vier zusammengehörigen PCR-Produkte nebeneinander auf das Gel aufgetragen, was bedeutet, daß das differentiell exprimierte Produkt jeweils in den beiden linken Spuren eine Bande ergeben sollte, in den beiden rechten Spuren jedoch nicht oder nur schwach.

Wenn dies der Fall war, wurde diese Bande wiederum ausgeschnitten, eluiert und reamplifiziert, nun allerdings nicht radioaktiv. Dieses Produkt wurde dann nochmals auf einem Agarosegel überprüft, aus diesem wiederum ausgeschnitten und eluiert, sodann wie in 3.2.12 - 3.2.16 beschrieben kloniert. Je 5 Klone pro ausgeschnittene Bande wurden an die Firma MWG Biotech, Ebersberg, zur Sequenzierung eingesandt.

#### 4.2.3. Vergleich der Sequenzdaten mit der Genbank

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der *Nucleotide Sequence Bank* des *Entrez* Browsers des National Institute of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA, unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>.) verglichen, hierzu wurde das “Basic local alignment search tool” (Blast search, (Altschul *et al*, 1997)) verwendet.

Abbildung 19 zeigt exemplarisch ein alignment einer Sequenz, die für mehrere aus einer Bande gewonnene Klone erhalten wurde.

```
emb|Z15005|HSCENPE H.sapiens CENP-E mRNA.
      Length = 8257
Plus Strand HSPs:
  Score = 2160 (596.8 bits), Expect = 2.9e-169, P = 2.9e-169
  Identities = 436/441 (98%), Positives = 436/441 (98%), Strand = Plus / Plus

Query:   65 GCACCTTCACCAAGATTGTGATGTACCATCCAGAGAATTAAGGGATCTCAAATTGAACCA 124
      |||
Sbjct: 6615 GCACCTTCAACAAGATTGTGATGTACCATCCAGAGAATTAAGGGATCTCAAATTGAACCA 6674

Query:   125 GAATATGGATCTACATATTGAGGAAATTCTCAAAGATTCTCAGAAAGTGAGTTCCCTAG 184
      |||
Sbjct: 6675 GAATATGGATCTACATATTGAGGAAATTCTCAAAGATTCTCAGAAAGTGAGTTCCCTAG 6734

Query:   185 CATAGAGACTGAATTTCAACAAGTACTAAGTAATAGGAAAGAAATGACACAGTTTTTGG 244
      |||
Sbjct: 6735 CATAAAGACTGAATTTCAACAAGTACTAAGTAATAGGAAAGAAATGACACAGTTTTTGG 6794

Query:   245 AGAGTGGTTAAATACTCGTTTTTGATATAGAAAAGCTTAAAAATGGCATCCAGAAAGAAAA 304
      |||
Sbjct: 6795 AGAGTGGTTAAATACTCGTTTTTGATATAGAAAAGCTTAAAAATGGCATCCAGAAAGAAAA 6854

Query:   305 TGATAGGATTTGTCAAGTGAATAACTTCTTTAATAACAGAATAATTGCCATAATGAATGA 364
      |||
Sbjct: 6855 TGATAGGATTTGTCAAGTGAATAACTTCTTTAATAACAGAATAATTGCCATAATGAATGA 6914

Query:   365 ATCAACAGAGTTTGAGGAAAGAAGTGCTACCATATCCAAAGAGTGGGAACAGGACCTGAA 424
      |||
Sbjct: 6915 ATCAACAGAGTTTGAGGAAAGAAGTGCTACCATATCCAAAGAGTGGGAACAGGACCTGAA 6974

Query:   425 ATCACTGAAAGAGAAAAATGAAAACTATTTAAAAAACTACCAAACATTGAAGACTTCCTT 484
      |||
Sbjct: 6975 ATCACTGAAAGAGAAAAATGAAAACTATTTAAAAAACTACCAAACATTGAAGACTTCCTT 7034

Query:   485 GGCATCTGGTGCCCCCTGGTAA 505
      |||
Sbjct: 7035 GGCATCTGGTGCCCAGGTAA 7055
```

Abbildung 19: Vergleich einer aus der RAP-PCR isolierten Sequenz mit der Genbank

Die Basenaustausche an den Positionen 6624 und 6739 führen nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz.

Im Verlauf der Arbeit wurden unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen und Patienten-RNAs insgesamt 20 Fingerprints erstellt, aus denen 6 Kandidatengene isoliert werden konnten:

### 4.3. Kandidatengene

Name des Gens	Genbank accession number
CENP-E (Zentromerprotein E)	Z15005
SDF-1 (stromal cell derived factor 1)	NM_000609
NF-YB (CAAT-box DNA binding protein subunit B)	X59710
TAK1c (TGF- $\beta$ activated kinase 1c)	AB009358
Cyclin B	M25753
HAUSP (herpesvirus associated ubiquitin-specific protease)	Z72499

*Tabelle 5: Isolierte Kandidatengene*

Die Aufreinigung über das SSCP-Gel sowie die Sequenzierung mehrerer Klone bieten zwar eine gewisse Sicherheit, dennoch muss aber die differentielle Expression der gefundenen Gene mit anderen Methoden verifiziert werden.

### 4.4. CENP-E

#### 4.4.1. Bestätigung der differentiellen Expression mit semiquantitativer RT-PCR

Da CENP-E das erste potentiell differentiell exprimierte Gen darstellte, wurden damit zunächst auch die weiterführenden Methoden etabliert. Zur Bestätigung der differentiellen Expression wurde semiquantitative RT-PCR verwendet. Es ist zwar allgemein anerkannt, daß kultivierte RA-Fibroblasten ihren aggressiven Phänotyp und ihr Genexpressionsmuster auch in Kultur über längere Zeit beibehalten (Gulko *et al*, 2000; Müller-Ladner *et al*, 1996), jedoch zeigten sich in unserer Erfahrung nach längerer Kultivierung (> 6 Passagen) doch gewisse Veränderungen im Wachstumsverhalten und der Genexpression. Daher wurde nur RNA aus Zellen verwendet, die maximal 5x passagiert worden waren. Dies und die eher geringe Ausbeute pro Flasche limitierten die verfügbare RNA-Menge auf wenige Mikrogramm pro Patient, was für andere geeignete Methoden wie Northern Blots nicht ausreichend gewesen wäre. Die hier eingesetzte Technik der „QuantumRNA<sup>™</sup>“ semiquantitative RT-PCR“ verwendet im Gegensatz zu anderen Quantifizierungsverfahren einen internen Standard, was sie für methodische Fehler weniger anfällig macht. Die 18S rRNA, die hier in jedem Ansatz mitamplifi-

ziert wird, ist in allen Zellen in etwa gleicher Menge vorhanden und daher gut als Standard geeignet. Allerdings ist die Menge an 18S rRNA in der Zelle sehr viel grösser als die Menge der mRNA, deren Expression untersucht werden soll. In einer normalen Multiplex-PCR würde dies zur ausschliesslichen Amplifikation des Standards führen. Daher werden bei der „QuantumRNA™ semiquantitative RT-PCR“ zusätzlich sog. Competimers eingesetzt, modifizierte 18S-Primer, die es ermöglichen, die Menge des entstehenden 18S-PCR-Produktes und somit die Stärke der resultierenden Bande zu regulieren (3.2.18).

Nachdem in Vorversuchen ein Mischungsverhältnis von 18S-Primer und Competimer von 1 zu 3 sowie eine Zyklenzahl in der PCR von 21 Zyklen als optimal bestimmt worden war, wurden die Versuche unter diesen Bedingungen durchgeführt. Die Annealingtemperatur betrug 55°C.

Für die Gelelektrophorese wurden ebenfalls verschiedene selbst hergestellte sowie fertig gekaufte Gele getestet. Die besten Ergebnisse konnten hier mit 4 – 20% PAA-Gradientengelen der Firma Novex erzielt werden.

#### 4.4.2. Auswertung der „QuantumRNA™ semiquantitative RT-PCR“ mit dem Phosphorimager

Zur Auswertung der Gele wurde ein Phosphorimager verwendet, da densitometrische Bestimmungen der Bandenstärke (aus einem auf das Gel aufgelegten Film) zu ungenau waren. Der Phosphorimager liefert ein relatives Maß für die Intensität der Bande und somit für die zugrundeliegende Menge an PCR-Produkt, indem er wie in 3.2.23 beschrieben die Menge an blauem Licht misst, die das angeregte Europium aus dem zuvor auf dem Gel exponierten *phosphor storage screen* emittiert. Weitere Vorteile ausser der Genauigkeit der Messung sind auch die, verglichen mit Röntgenfilm, etwa 10x höhere Sensitivität des *phosphor storage screens* sowie die Linearität der erhaltenen Ergebnisse über einen Bereich von 5 Grössenordnungen, was auch den Vergleich sehr unterschiedlich starker Banden ermöglicht.

Die mit dem Phosphorimager erhaltenen Daten wurden sodann in Microsoft® Excel exportiert. Hier wurde jeweils der Quotient aus dem Intensitätswert („Volume“) der genspezifischen Bande (hier: CENP-E) und dem Intensitätswert für die 18S-rRNA-Bande gebildet und mit diesen Quotienten (die die relative Expression der CENP-E-mRNA, normalisiert auf die eingesetzte RNA-Menge, darstellen), ein Balkendiagramm erstellt.

Das Experiment wurde viermal durchgeführt, um statistisch verwertbare Daten zu erhalten. Aus den gewonnenen Daten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanz be-

rechnet. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

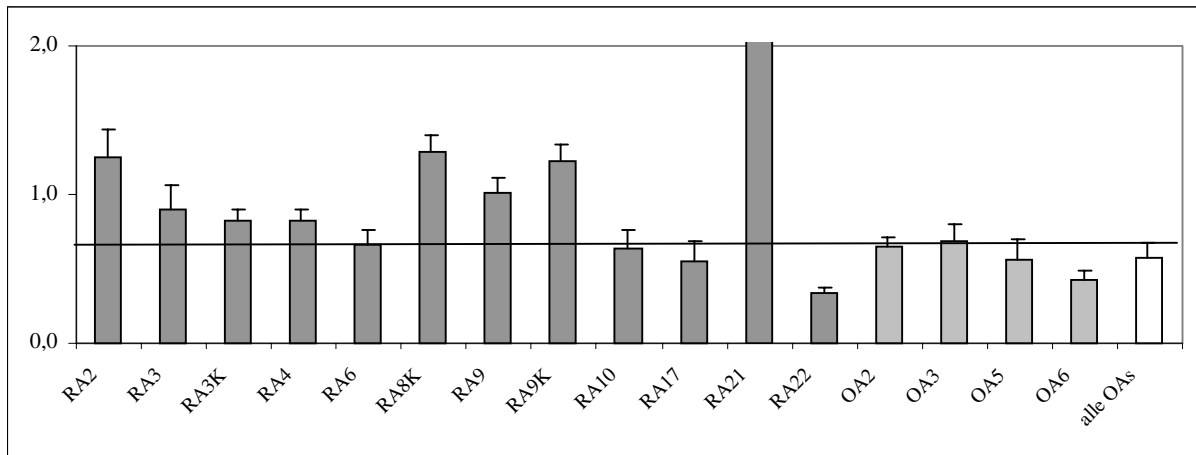


Abbildung 20: Auswertung von 4 Quantum-Experimenten zur Bestimmung der rel. Expression von CENP-E

8 von 12 Patienten zeigten eine signifikante Erhöhung der CENP-E-mRNA-Expression im Vergleich zu den OA-Kontrollen (Abbildung 20). In weiteren Versuchen konnte auch die deutlich höhere Expression von CENP-E in 6 weiteren RA-Fibroblastenkulturen im Vergleich zu Fibroblasten eines Patienten mit Psoriasisarthritis gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Um festzustellen, ob die Medikation der Patienten, aus deren Gewebe die verwendeten Fibroblasten gewonnen wurden, einen Einfluss auf die Expression von CENP-E hat, wurde überprüft, ob die Patienten oral verabreichte Steroide, Methotrexat oder Gold erhielten. Es ergab sich jedoch keine Korrelation zwischen der Art der Medikation und der CENP-E-Expression.

#### 4.4.3. Überprüfung der Expression von CENP-E mit in situ-Hybridisierung

Zur Lokalisation der CENP-E-überexprimierenden Zellen im Gewebe wurden in situ Hybridisierungen mit CENP-E-spezifischen RNA-Sonden an Gefrierschnitten durchgeführt. Der zur Sondenherstellung verwendete Vektor wurde zuvor nochmals sequenziert, sodaß sichergestellt war, daß die Sonden für die korrekte Sequenz spezifisch waren.

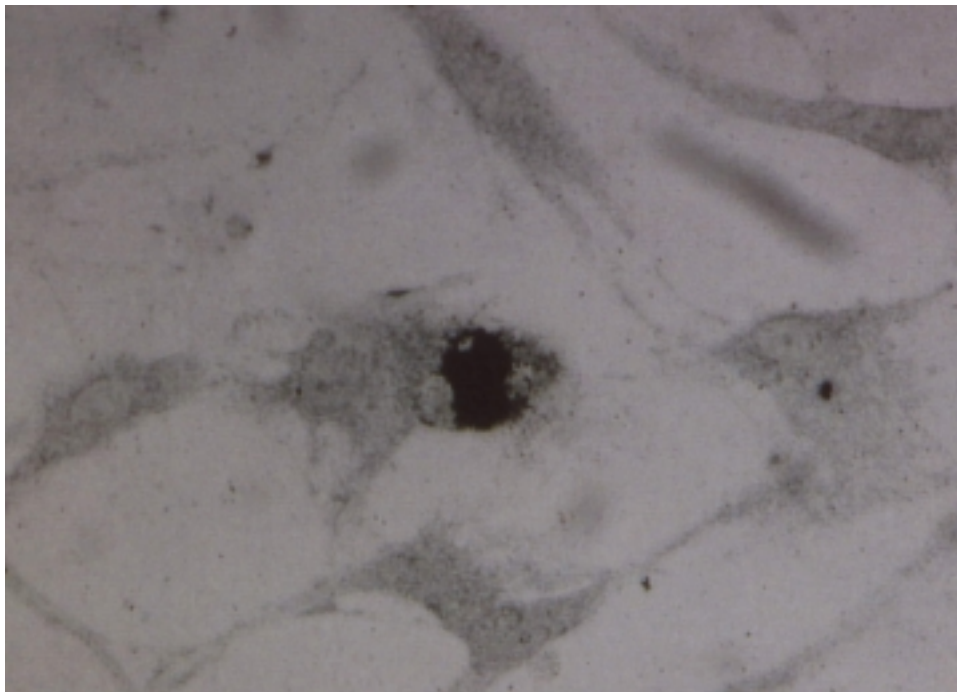
Bei den verwendeten RA-Geweben zeigte sich in etlichen Zellen ein positives Signal, wohingegen in OA-Geweben kein Signal erhalten werden konnte. Die Zellen, die im RA-Gewebe positiv für CENP-E-mRNA erschienen, befanden sich sowohl in der synovialen Deckzellschicht als auch im sublining. Um zu überprüfen, welcher Zelltyp CENP-E exprimiert, wurde auch eine Doppelmarkierung mit Anti-Fibroblastenantikörpern durchgeführt, die zeigte, daß CENP-E im RA-Synovium hauptsächlich von Fibroblasten exprimiert wird.

#### 4.4.4. Immunhistochemischer Nachweis

Um die Expression von CENP-E auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Hier kam ein anti-CENP-E-Antikörper zum Einsatz, der freundlicherweise von Dr. Tim Yen, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA zur Verfügung gestellt wurde (Yen *et al*, 1991; Yen *et al*, 1992).

Die intensivste Expression konnte in stark entzündeten Bereichen im sublining bei RA-Patienten gezeigt werden. Auch auf Proteinebene lag die CENP-E-Expression bei OA-Geweben unter der Nachweisgrenze.

Immunzytochemische Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten zeigten ebenfalls deutliche CENP-E-Expression in etlichen RA-Fibroblasten, während in OA-Fibroblasten kein Signal erhalten wurde.



*Abbildung 21: Immunzytochemische Darstellung von CENP-E in RA-Fibroblasten in Kultur. Immunogold-Silber-Färbung x 800; der CENP-E Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Tim Yen, Fox Chase Center, Philadelphia, PA zur Verfügung gestellt*

#### 4.4.5. Funktionelle Untersuchungen

Um die Unabhängigkeit der CENP-E-Expression von Steroideinwirkungen zu bestätigen, die sich bereits bei der Auswertung der Medikation der Patienten gezeigt hatte, wurden RA-Fibroblasten für 6 h mit physiologischen Konzentrationen von  $10^{-7}$  und  $10^{-9}$  mmol/l Prednisolon stimuliert. Zum Einsatz kamen hier 3 Kulturen von Patienten, die eine CENP-E-



Hochregulierung gezeigt hatten (RA 8, RA 9, RA 21), sowie drei Kulturen, die keine Hochregulierung erkennen liessen (RA 10, RA 17, RA 22).

Anschliessend wurde aus diesen Zellen wiederum RNA isoliert und die Höhe der CENP-E-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Auch hier konnte kein Einfluss auf die CENP-E-Expression festgestellt werden.

Ebenso wurden die Wachstumsraten der entsprechenden Kulturen überprüft. Hierzu wurden die Zellen in mehreren Kulturplatten mit je 6 Vertiefungen ausgesät, dann wurden 4 Tage lang jeden Tag die Zellen aus je 2 Vertiefungen abtrypsiniert und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Auch hier fand sich kein signifikant schnelleres Wachstum der CENP-E-hochexprimierenden Fibroblasten im Vergleich zu den CENP-E-niedrigexprimierenden Fibroblasten.

#### 4.4.6. Klonierung der gesamten CENP-E-cDNA

Da es sich gezeigt hatte, daß CENP-E in RA-Fibroblasten spezifisch hochreguliert ist, sollte nun versucht werden, durch Überexpression von CENP-E in normalen Fibroblasten deren Phänotyp zu verändern. Hierzu sollte die zur CENP-E-mRNA komplementäre cDNA in einen Expressionvektor (pcDNA 3.1) kloniert werden, um damit gesunde Fibroblasten zu transfizieren. Obwohl hier für die PCR spezielle Polymerasenmischungen (Boehringer „Expand High Fidelity“ und „Expand Long Template PCR System“, z.B. (Megonigal *et al*, 1997)) eingesetzt wurden sowie auch versucht wurde, die cDNA in 3 Teilen zu amplifizieren, gelang es nicht, ein entsprechendes Konstrukt herzustellen. Alle erhaltenen PCR-Produkte, die kloniert und sequenziert wurden, enthielten multiple Fehler im Vergleich zur Originalsequenz (Genbank accession number Z15005). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, daß die mRNA für CENP-E eine Länge von ca. 8 kb hat und die Sequenz zu 43% (3429 b) aus Adenin besteht. Dies bedingt, daß häufig mehrere Adenin-Nukleotide (5-6) hintereinander vorkommen. DNA-Polymerasen „verrutschen“ an solchen Sequenzen manchmal um eine Base, sodaß Leserasterverschiebungen entstehen können.

#### 4.5. TAK1c, HAUSP, Cyclin B und NF-Y

Für die mRNAs von TAK1c, HAUSP und NF-Y B konnten die in der RAP-PCR gefundenen Unterschiede in der Expression mit semiquantitativer RT-PCR nicht bestätigt werden, weder mit QuantumRNA noch später im LightCycler.

Cyclin B wurde nicht weiter bearbeitet.

## 4.6. SDF-1

### 4.6.1. Semiquantitative RT-PCR

Für SDF-1 (auch bezeichnet als HIRH (human intercrine reduced in hepatomas) bzw. PBSF (pre-B-cell stimulating factor)) zeigte sich in der semiquantitativen RT-PCR bei allen untersuchten OA-Fibroblasten eine relativ gleichmässige Expression, während es in der Gruppe der RA-Fibroblasten erhebliche Unterschiede in der SDF-1-Expression gab. Während ein Teil SDF-1-mRNA in ebenso grossen Mengen produzierte wie die OA-Fibroblasten, zeigte der andere Teil nur eine geringe Expression, etwa auf dem Niveau der ebenfalls als Kontrolle verwendeten Normalhautfibroblasten. Als optimale Bedingungen für die QuantumRNA-PCR wurden hier in Vorversuchen 24 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 52° und einem 18S Primer/ Competimerverhältnis von 1:3 bestimmt. Diese Bedingungen wurden bei allen folgenden Versuchen verwendet.

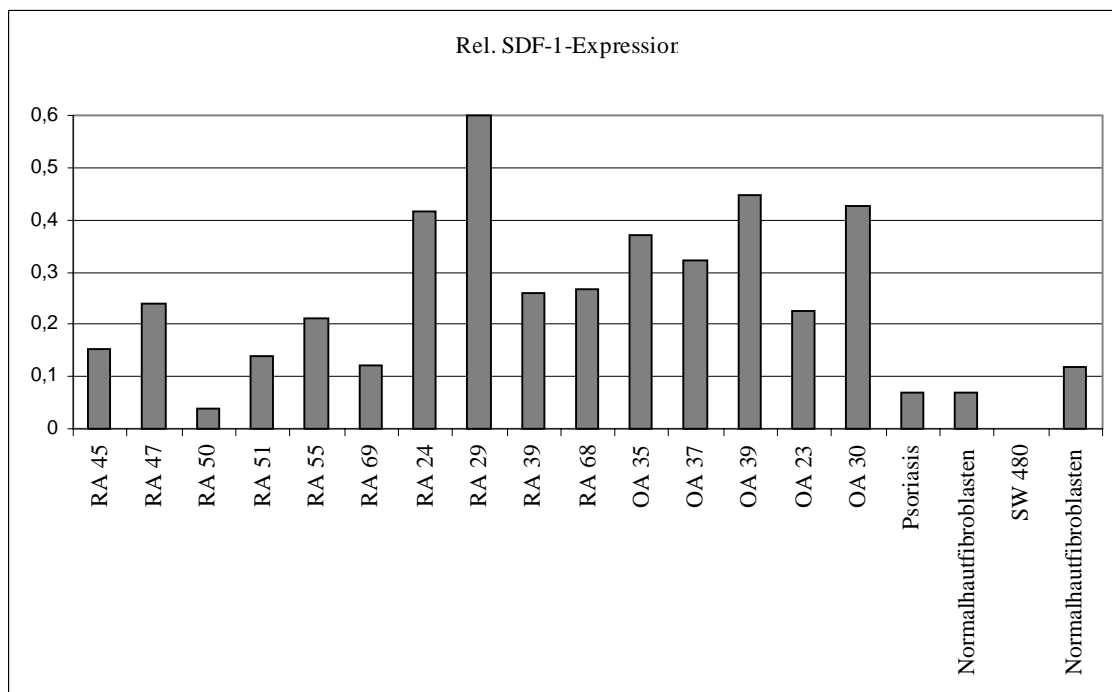


Abbildung 22: Auswertung einer semiquantitativen RT-PCR (repräsentatives Beispiel); Psoriasis: synoviale Fibroblasten eines Patienten mit Psoriasisarthritis; SW480: Kolonkarzinomzelllinie

Die ebenfalls als Kontrolle mitgeführte Kolonkarzinomzelllinie SW 480 zeigte erwartungsgemäß keine SDF-1-Expression (Begum *et al*, 1996).

#### 4.6.2. Korrelation mit den Patientendaten

Um den Grund für diese unterschiedliche SDF-1-Expression aufzudecken, wurden die Akten der Patienten auf eventuell vorhandene Unterschiede in Medikation oder Krankheitsgeschichte überprüft. Es schien hiernach zunächst, als ob eine inverse Korrelation zwischen dem Blutspiegel des Entzündungsmarkers CRP (C-reaktives Protein) und der SDF-1-Expression bestünde. Diese Tendenz schien sich auch bei weiteren untersuchten Fibroblastenkulturen zu bestätigen, allerdings zeigten sich auch immer wieder Abweichungen.

Um diese Korrelation und auch die Reproduzierbarkeit der Quantum-Experimente weiter zu überprüfen, wurden auch Realtime-PCR-Versuche durchgeführt, zunächst mit einem GeneAnalyzer 7700 („TaqMan“, PE Applied Biosystems) bei Prof. Gay am Zentrum für experimentelle Rheumatologie des Universitätsspitals Zürich.

Auch hier ergaben sich deutliche Unterschiede in der SDF-1-Expression zwischen Fibroblasten von RA-Patienten mit hohen und niedrigen CRP-Werten.

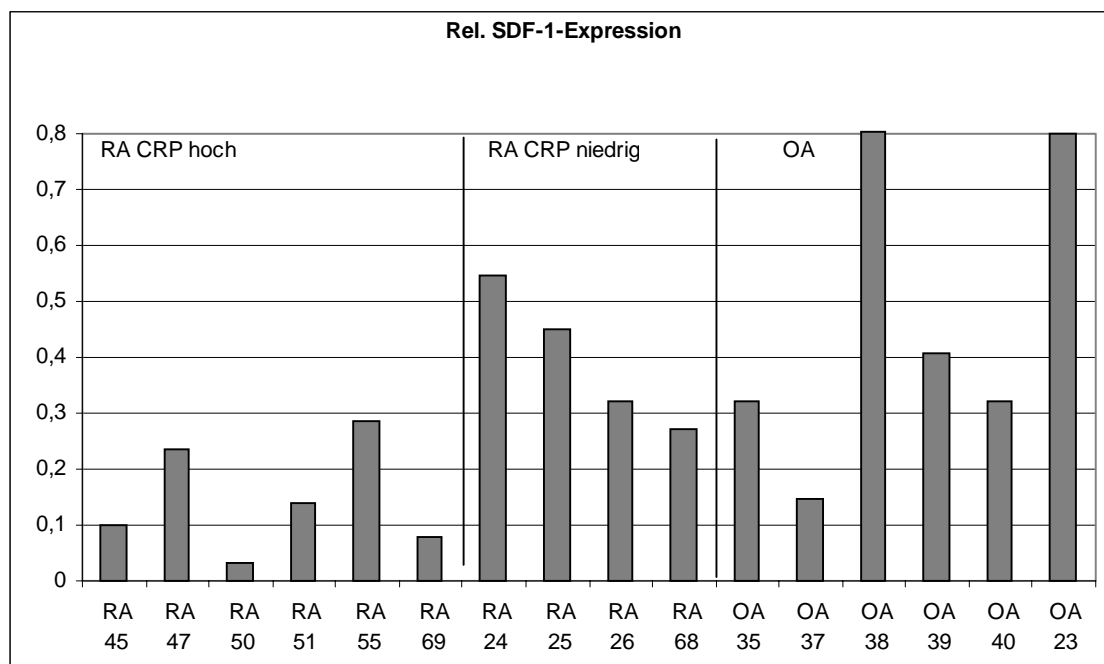


Abbildung 23: Auswertung der realtime-PCR für SDF-1 mit dem TaqMan (Durchschnittswerte aus 2 Versuchen)

Die Ergebnisse zweier weiterer RA-Fibroblastenkulturen von Patienten mit niedrigem CRP, die bei dieser Versuchsserie auch mituntersucht wurden, mussten ausgeschlossen werden, da der Verdacht bestand, daß die verwendete RNA teilweise degradiert war.

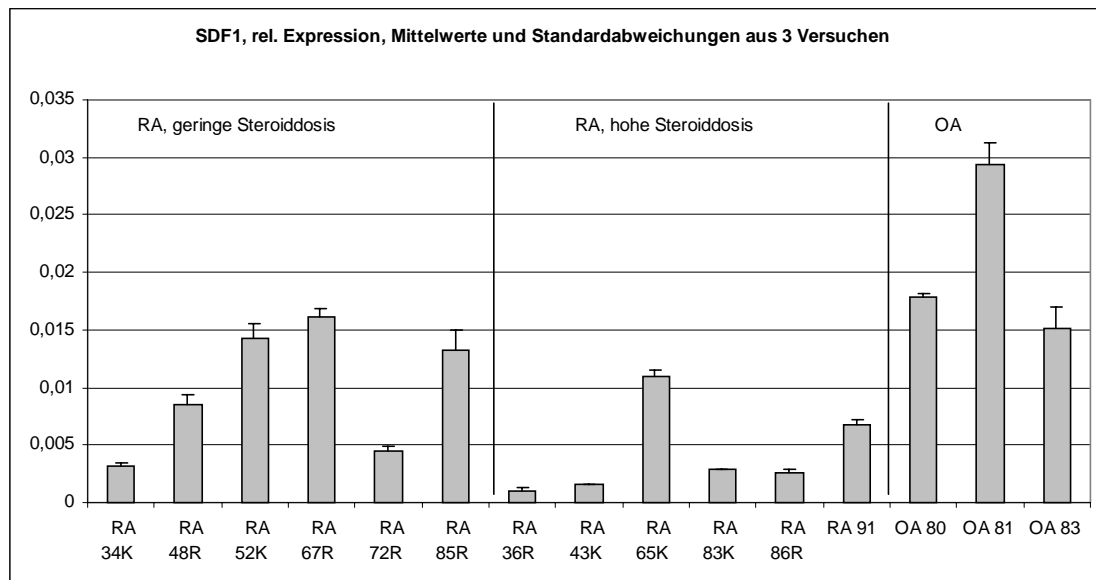
Es konnte bei diesen Versuchen auch gezeigt werden, daß die mit der Quantum-Methode und die mit dem TaqMan bestimmten relativen Expressionswerte insgesamt gut übereinstimmten

(Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte sich ebenso bei später durchgeführten Versuchen mit dem LightCycler.

Nachdem ab Oktober 2000 ein LightCycler zur Verfügung stand, konnte eine Real-Time-PCR für alle derzeit zur Verfügung stehenden Proben durchgeführt werden. Obwohl erhebliche Unterschiede in der SDF1-Expression gefunden wurden, konnte kein statistisch nachweisbarer Zusammenhang zwischen SDF1-Expression und CRP-Wert der Patienten belegt werden.

Eine nochmalige Durchsicht der Unterlagen der Patienten, deren SDF1-Level besonders hoch bzw. niedrig waren, ergab deutliche Unterschiede in der Steroiddosis, mit der diese Patienten behandelt wurden. Patienten, deren Fibroblasten besonders viel SDF produzierten (mindestens 75% über dem Mittelwert;  $n=7$ ), wurden mit wenig oder gar keinen Steroiden behandelt (im Mittel mit  $1,79 \pm 2,4$  mg). Die Gruppe, deren SDF1-Expression besonders niedrig war (mindestens 75% unter dem Mittelwert;  $n=6$ ) wurde durchschnittlich mit  $8,75 \pm 5,9$  mg Steroiden behandelt. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p=0,015$ ).

Zur Überprüfung dieser Feststellung wurden nochmal RNAs von Patienten, die besonders viel oder wenig Steroide erhalten hatten, in einer Gruppe in neuen Versuchen eingesetzt, um eventuell mögliche Fehler durch den Vergleich von Daten, die in verschiedenen LC-Läufen gewonnen worden waren, ausschliessen zu können. Auch hier bestätigte sich die zuvor gemachte Beobachtung, daß hohe Steroiddosen einen Einfluss auf die SDF1-Expression haben.



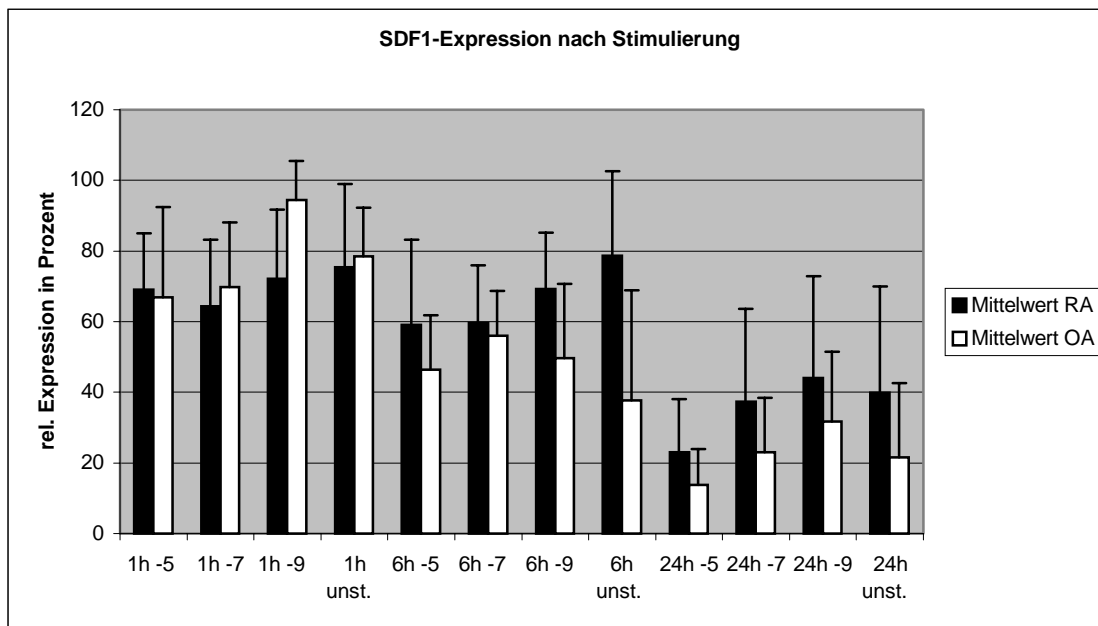
*Abbildung 24: Relative SDF1-Expression von Fibroblasten aus Patienten mit hoch- bzw. niedrigdosierter Steroidbehandlung*

Patient	Steroiddosis (mg/ Tag)
RA 34	0
RA 48	2,5
RA 52	2,5
RA 67	0
RA 72	0
RA 85	2
RA 36	10
RA 43	20
RA 65	10
RA 83	12
RA 86	7,5
RA 91	10
OA 80	0
OA 81	0
OA 83	0

*Tabelle 6: Steroiddosen der Patienten, deren RNAs in den in Abbildung 24 gezeigten LC-Versuchen eingesetzt wurden*

Aufgrund dieser Feststellung wurden funktionelle Untersuchungen begonnen. Fibroblasten mehrerer Patienten wurden mit Steroiden stimuliert (3.2.27), die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und zur RNA-Isolierung verwendet. Anschliessend wurde die Expression von SDF1-mRNA sowie CXCR4-mRNA mit realtime-PCR überprüft.

Die Versuche ergaben, daß die Stimulierung selbst mit hohen Dosen an Prednisolon ( $10^{-5}$  M) die Expression von SDF1-mRNA in 24h nur wenig beeinflusst. Generell nahm die Menge an SDF1-mRNA mit der Zeit ab (Abbildung 25).



*Abbildung 25: Durchschnittliche relative SDF1-Expression nach Stimulierung (1h -5: für 1 h mit  $10^{-5}$  M Prednisolon stimuliert; unst.: unstimuliert; Mittelwert und Standardabweichung aus 9 (RA) bzw. 5 (OA) Versuchen, höchster Wert = 100%)*

Die Expression von CXCR4-mRNA, dem Rezeptor für SDF1, hingegen wurde durch Prednisolonstimulierung dosis- und zeitabhängig deutlich reduziert.

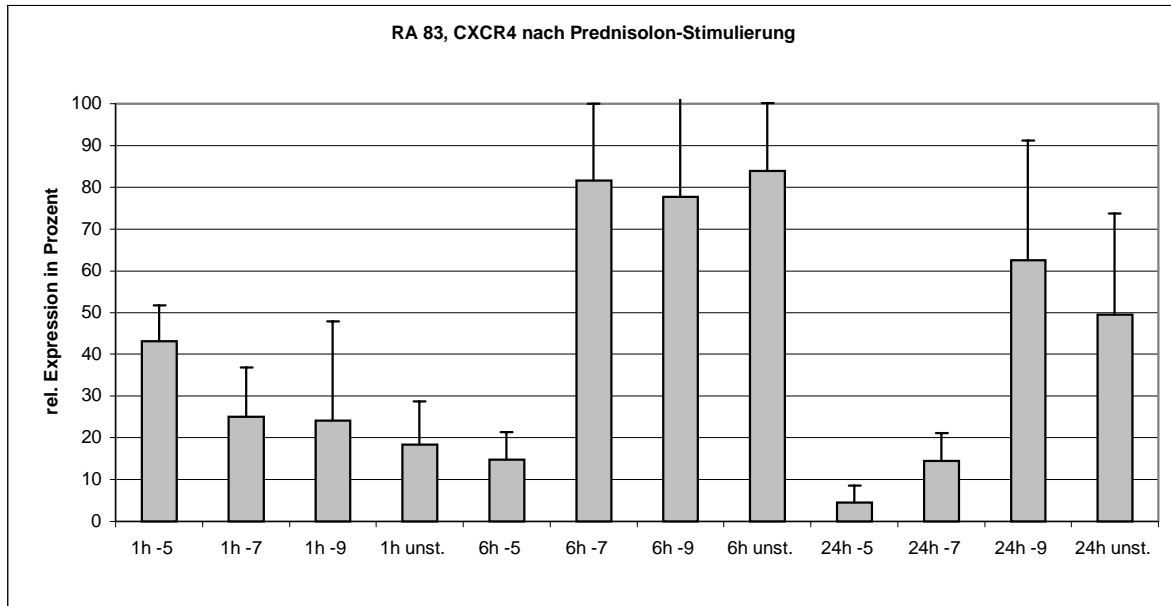


Abbildung 26: Zusammenfassung von 4 LightCycler-Versuchen, Erklärung s. Text

Abbildung 26 zeigt repräsentativ die Auswertung der Stimulierung von Fibroblasten eines RA-Patienten. Es wurden je 2 Vertiefungen einer 6-well-Platte identisch stimuliert, jede daraus gewonnene cDNA wurde dann in 2 unabhängigen LightCycler-Versuchen quantifiziert. Es wurden somit für jeden Messpunkt 4 Werte gewonnen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jeweils der höchste relative Expressionswert auf 100% gesetzt, alle anderen Werte wurden entsprechend umgerechnet. Es zeigt sich für die relativ hohe Dosis von  $10^{-5}$  M Prednisolon bereits nach sechsstündiger Stimulierung eine deutlich geringere CXCR4-mRNA-Expression, nach 24 Stunden ist die Expression auch bei mit nur  $10^{-7}$  M Prednisolon behandelten Fibroblasten deutlich niedriger als bei den unstimulierten Kontrollen. Bei weiteren Versuchen mit anderen Fibroblasten war nach 24 Stunden bei  $10^{-5}$  M Prednisolon mehrfach überhaupt keine CXCR4-mRNA mehr nachweisbar.

#### 4.6.3. SDF1-ELISA

Aufgrund der relativ geringen Empfindlichkeit des einzigen kommerziell erhältlichen ELISAs konnte SDF1-Protein erst in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden, die sich zumindest 3 Tage auf den Zellen befanden. Nach dieser Zeit fanden sich in allen untersuchten Überständen, sowohl von RA- als auch von OA-Fibroblasten, Konzentrationen von 4 – 7 ng/ ml SDF1. Da kultivierte Fibroblasten auch den Rezeptor für SDF1, CXCR4, produzieren und dieser eine hohe Affinität für SDF1 zeigt (Di Salvo *et al*, 2000), und SDF1 auch mit hoher Affinität an

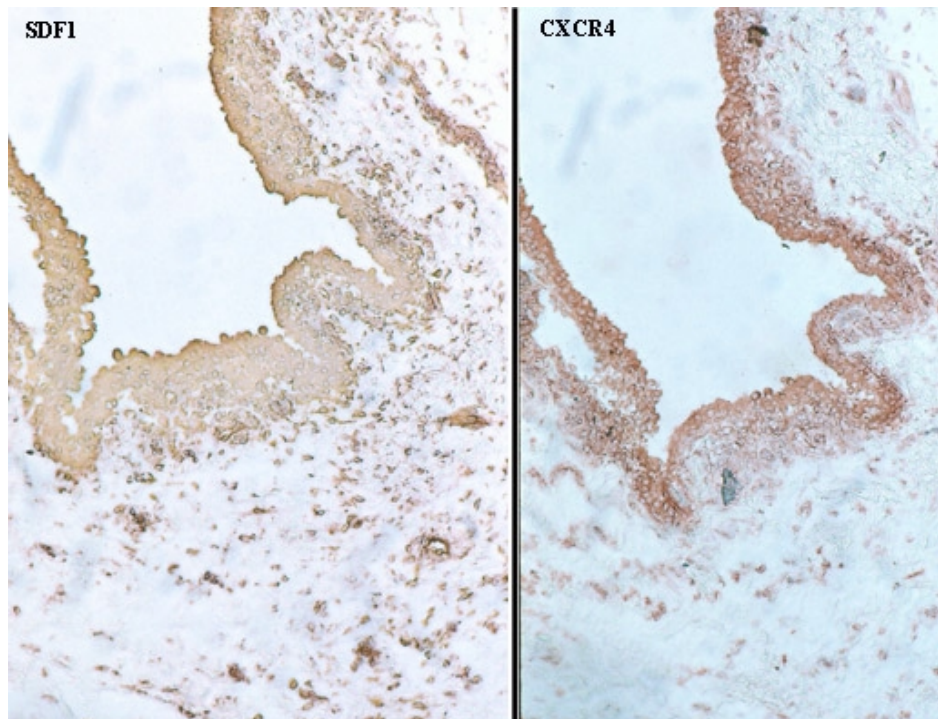
Glycosaminoglycane an der Zelloberfläche bindet (Gupta *et al*, 2001), ist es wahrscheinlich, daß nur ein geringer Teil des von den Zellen produzierten Chemokins frei im Überstand vorliegt.

#### 4.6.4. SCID-Maus-Versuche

In diesen Experimenten sollte festgestellt werden, ob die Invasivität der synovialen Fibroblasten im SCID-Maus-Modell von der SDF1-Produktion der jeweils verwendeten RA-Fibroblasten abhängt. Dazu wurden Fibroblasten aus 8 verschiedenen Patienten eingesetzt, deren CRP-Werte besonders hoch bzw. niedrig waren, da zum Zeitpunkt der Versuche noch die Annahme bestand, daß SDF1-Expression und CRP-Wert der Patienten korreliert seien. Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Aggressivität der Zellen und dem CRP-Wert hergestellt werden. Eine Wiederholung der Versuche zu einem späteren Zeitpunkt mit anderen Fibroblasten war leider aus technischen Gründen nicht möglich.

#### 4.6.5. Immunhistochemie

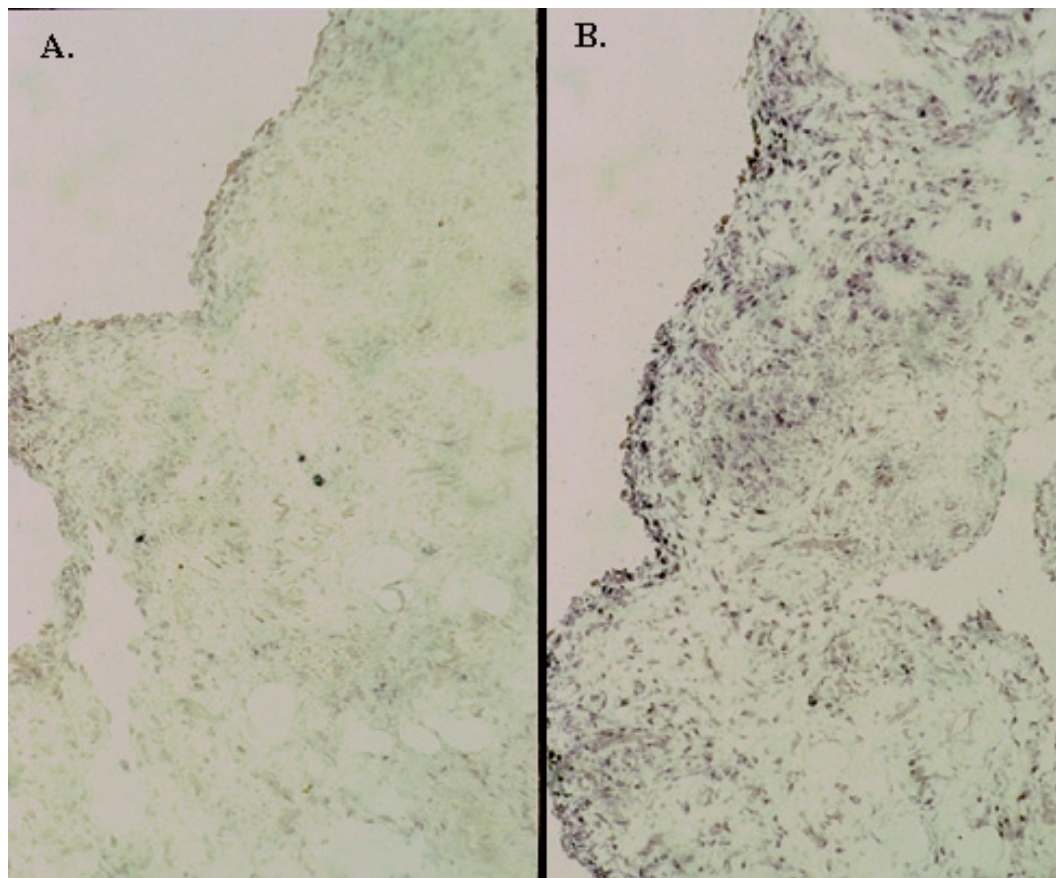
Der Nachweis von SDF1- und CXCR4-Protein im Gewebe zeigte, daß beide Proteine sowohl im lining layer als auch im sublining zu finden sind. Eine stärkere Färbung fand sich im lining layer und in lymphozytären Infiltraten sowie in der direkten Umgebung von Blutgefäßen.



*Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis von SDF1 und CXCR4 (Patient: RA 75; SDF1-AK: R&D Diagnostics, Kat. Nr. MAB 350; CXCR4-AK: Pharmingen, Kat.Nr. 36190D)*

#### 4.6.6. In-situ Hybridisierung

Auch der mRNA-Nachweis in Gewebedünnschnitten zeigte eine starke SDF1-mRNA-Expression in allen untersuchten Geweben.



*Abbildung 28: in situ- Hybridisierung mit einer SDF1-Sonde. Links die Negativkontrolle mit der sense-Sonde (A), rechts die antisense-Sonde (B).*

#### 4.6.7. Chemotaxis

PBMCs (mononukleäre Zellen aus peripherem Blut) aus dem Blut von RA-Patienten zeigten in Chemotaxisversuchen z.T. deutlich stärkere Wanderung auf SDF1 als PBMCs aus dem Blut von gesunden Kontrollpersonen. Auch hier ergaben sich jedoch abhängig von der Versuchsperson deutliche Unterschiede, sodaß keine einheitliche Aussage getroffen werden kann. Auffällig war allerdings, daß RA-PBMCs generell mehr auf SDF1 in einer Konzentration von 100 ng/ ml als 1 µg/ml wanderten. Dieser Effekt wurde auch von anderen Gruppen beobachtet



und als konzentrationsabhängige Anziehung bzw. Abstossung gedeutet (Poznansky *et al*, 2000; Suzuki *et al*, 2001).

Auch mit synovialen Fibroblasten wurden Chemotaxisversuche durchgeführt. Hierzu mussten die Bedingungen variiert werden, da Fibroblasten im Gegensatz zu PBMCs auf normales Kulturmedium ohne FCS, dem SDF1 zugesetzt wurde, keine Wanderung zeigen. Auch sind längere Inkubationszeiten notwendig. Wurde konditioniertes Medium von RA- oder OA-Fibroblasten bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden eingesetzt, wanderten jedoch sowohl RA- als auch OA-Fibroblasten in grösserer Anzahl. Fibroblasten aus gesundem Synovium zeigten hingegen kaum chemotaktisches Verhalten.

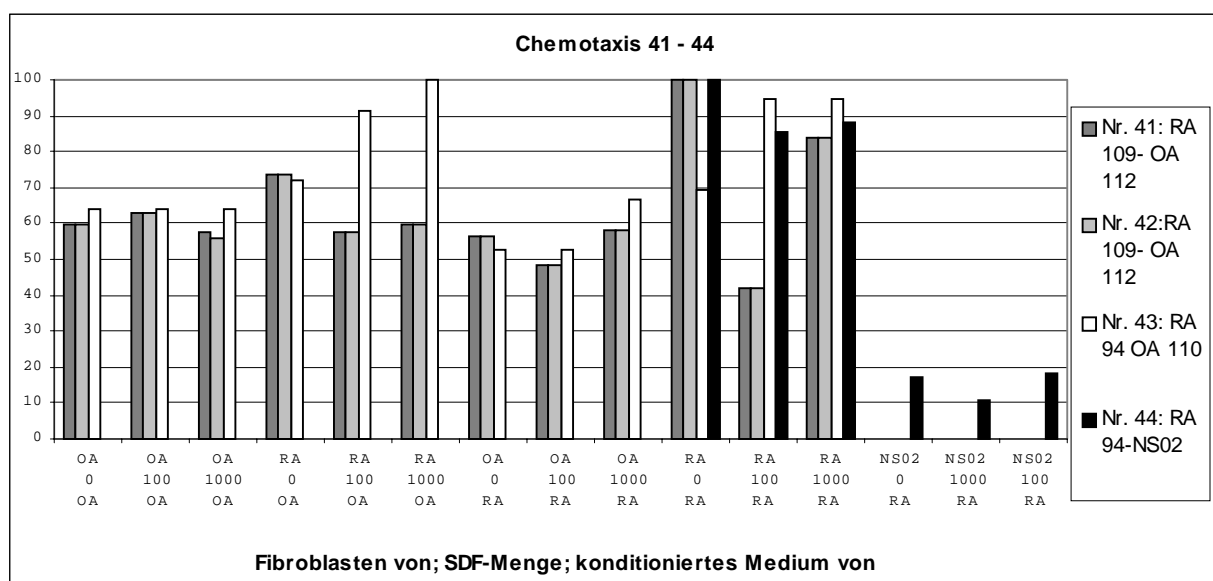


Abbildung 29: Auswertung von 4 Chemotaxisversuchen: RA- und OA-Fibroblasten wandern deutlich mehr als Normalsynoviumfibroblasten; SDF1 erhöht zum Teil die Zahl der wandernden Zellen (zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde jeweils der Höchstwert auf 100% gesetzt, die anderen Ergebnisse wurden entsprechend umgerechnet)

#### 4.7. MOMeNT

Bei der Arbeit mit kultivierten Fibroblasten ist nicht mit Sicherheit zu bestimmen, aus welchem Bereich des Synoviums die Zellen stammen. Daher wurde dann analog zu bereits im Labor etablierten Methoden für Kolonadenome (Lechner *et al*, 2001) die Lasermikrodissektion, verbunden mit RAP-PCR, etabliert. Dieses Verfahren ermöglicht den Vergleich verschiedener Bereiche desselben Gewebeschnittes.

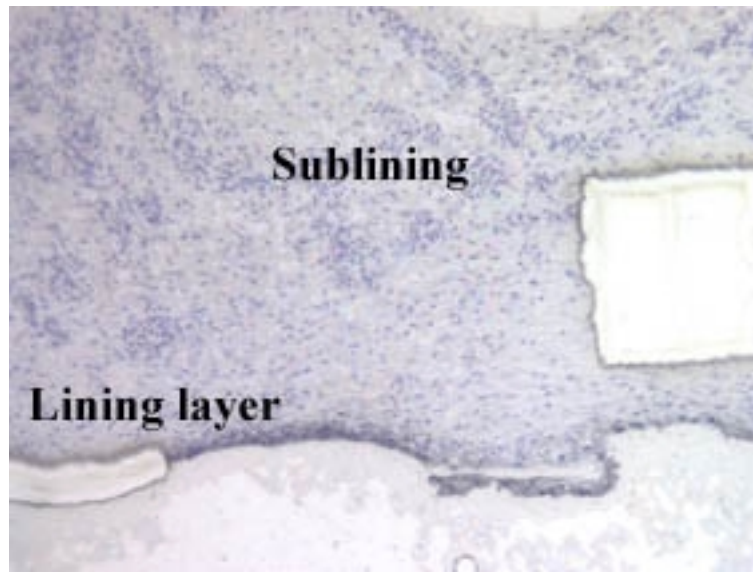


Abbildung 30: Gewebedünnschnitt, aus dem ein Teil des linings sowie ein Bereich aus dem sublining ausgeschnitten wurden.

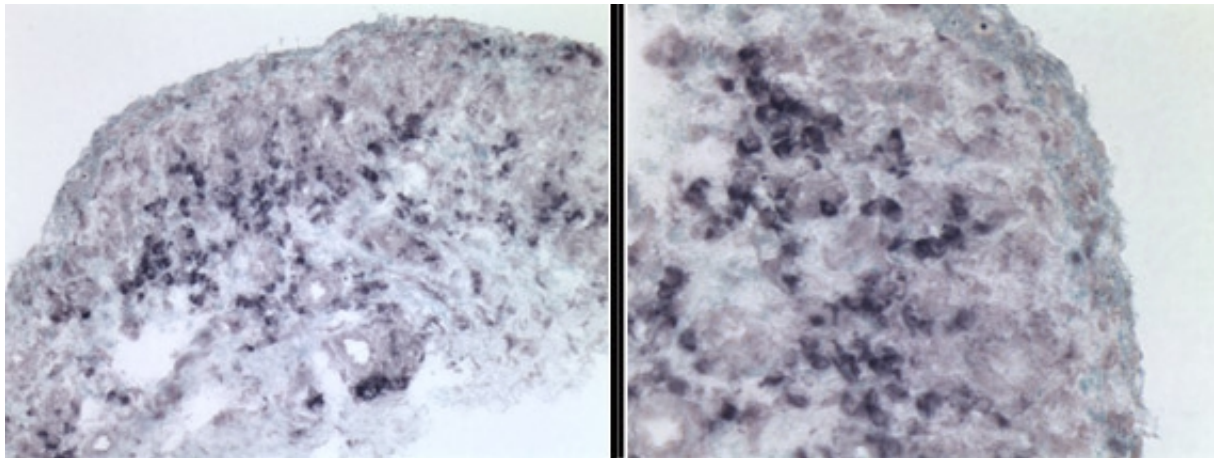
In Vorversuchen zeigte sich, daß aus einem etwa 600 Zellen beinhaltenden Bereich, der aus einem 8 µm dicken Gewebedünnschnitt ausgeschnitten wird (s. Abbildung 30), ausreichend RNA gewonnen werden kann, um einen stabilen Fingerprint zu erhalten (3.2.28). Im Folgenden wurde dann von mehreren Patienten sowohl der lining layer als auch die Invasionszone, also der Bereich, in dem das Synovium am Knorpel anhaftet und Fibroblasten den Knorpel zerstören, mit Bereichen aus dem sublining verglichen. Nach Aufreinigung über SSCP-Gele, Klonierung und Sequenzierung konnten folgende Kandidatengene identifiziert werden:

Gen	genbank acces- sion number	vermehrt exprimiert im	bp
Human fibronectin (FN1)	U42457.1	lining	419
H. sapiens Cip1-interacting zinc-finger protein (CIZ1)	XM 011842.1	sublining	266
H. sapiens thrombospondin 4 (THBS 4)	NM 003248.1	lining	103

Tabelle 7: Durch MOMeNT und anschließende RAP-PCR identifizierte Kandidatengene (bp: Länge der erhaltenen Sequenz, die mit dem Genbankeintrag übereinstimmt)

Da für jede ausgeschnittene Bande 5 Klone sequenziert wurden, die jeweils alle dieselbe Sequenz ergaben, war anzunehmen, daß die gefundene Verteilung sich auch im Gewebe zeigen würde. Die Bestätigung der differentiellen Expression dieser Gene mittels in situ-Hybridisierung ist auch bereits gelungen. Auch hier wurde Fibronectin im lining layer und

Ciz1 im sublining nachgewiesen. Thrombospondin 4 wurde nur in einzelnen Zellen im sublining sowie häufiger im lining gefunden.

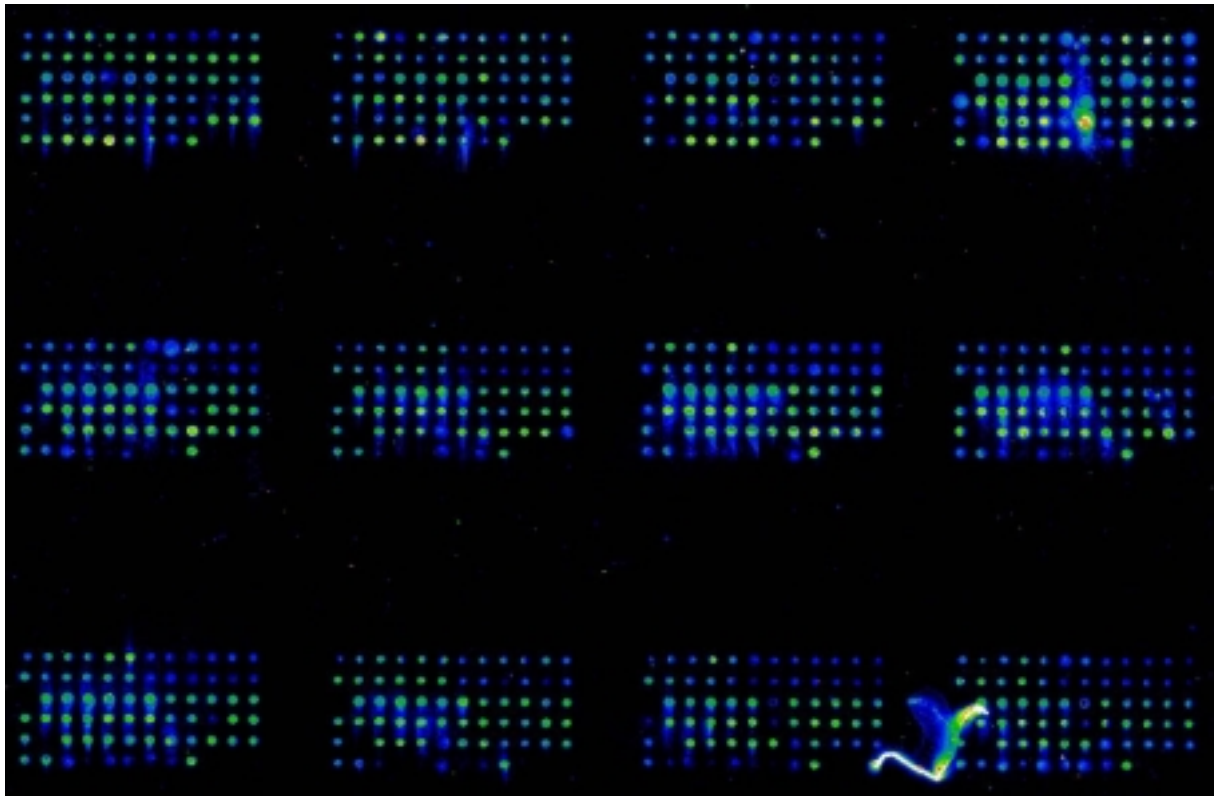


*Abbildung 31: in situ-Hybridisierung mit einer Sonde für Ciz1; keine Färbung im lining, deutliches Signal im sublining (Vergrößerung: links: 200fach, rechts 400fach)*

## **4.8. RAP-PCR-Mikroarrays**

### **4.8.1. Herstellung der Arrays**

Die Optimierung der Bedingungen zur Herstellung der Mikroarrays konnte aufgrund der am Sidney Kimmel Cancer Center (SKCC) bereits vorhandenen Erfahrung in diesem Bereich relativ schnell erfolgen. Nach Konzentration der RAP-PCR-Proben war die Intensität der spots nach Färbung mit SYBRGreen II hoch genug, um ein gutes Hybridisierungssignal erwarten zu können (G. Rondeau, pers. Mitt.; Abbildung 32).



*Abbildung 32: Ausschnitt eines mit SYBRGreen II gefärbten Arrays; je höher der Grünanteil, desto grösser die DNA-Menge*

Da die Verwendung von doppelsträngigen DNA-Sonden nicht zu einem guten Hybridisierungsergebnis führte (s. 3.3.3), wurden im Weiteren RNA-Sonden verwendet. Mit diesen Sonden konnte ein gutes Signal sowohl von den mitgespotteten PCR-Produkten als auch von IMAGE-Klonen (Positivkontrollen) als auch von RAP-PCR-Produkten erhalten werden.

Jede Sonde ergab ein Signal für höchstens zwei verschiedene Primerkombinationen, jeweils mit fast allen Patientenproben (Abbildung 33). Da mit jeder Primerkombination höchstens wenige hundert Sequenzen amplifiziert werden, war dies auch zu erwarten.

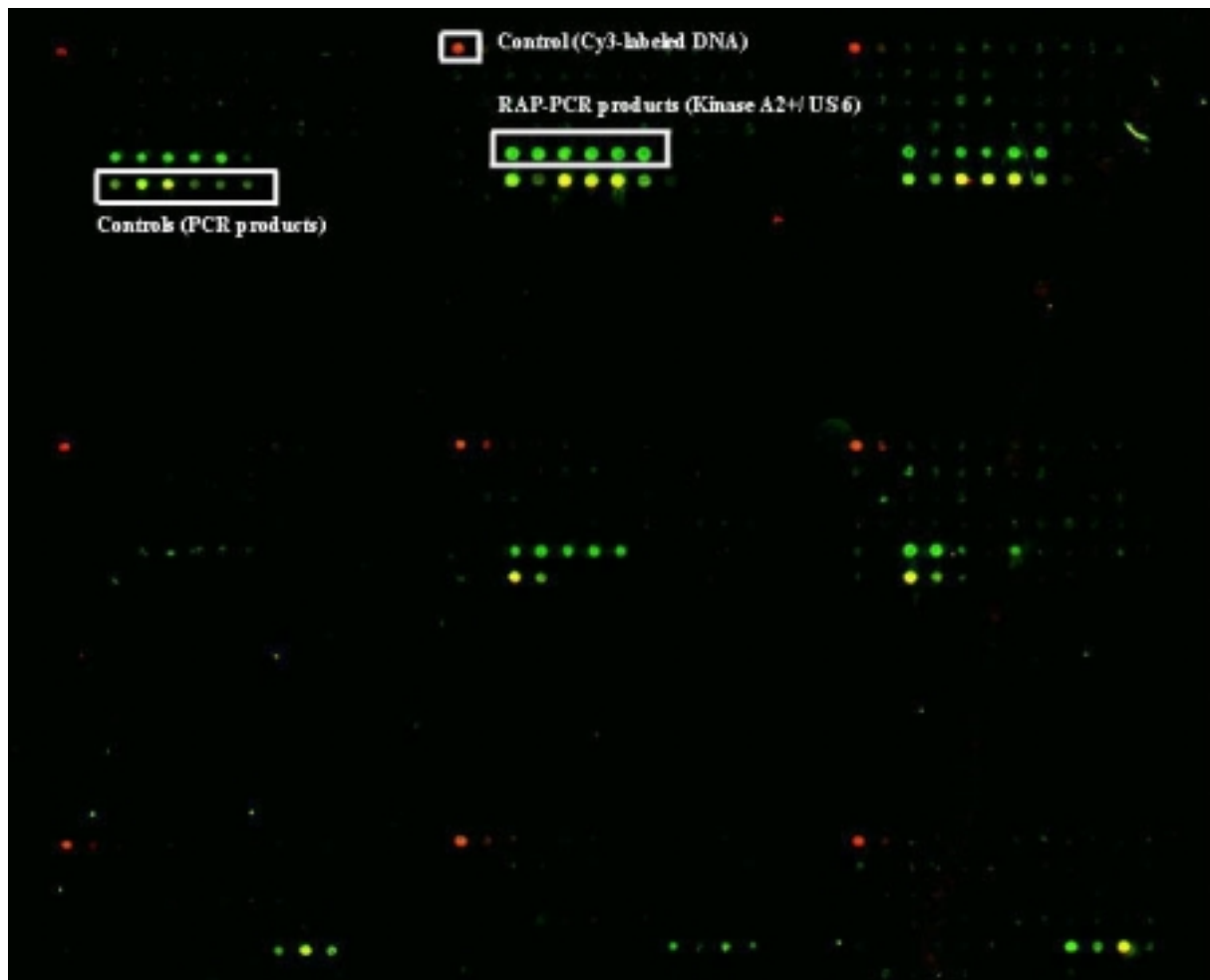


Abbildung 33: Ausschnitt einer Arrayauswertung mit QuantArray. Rot bedeutet Signal im Cy3-Kanal, grün Signal im Cy5-Kanal, gelb Signal in beiden Kanälen. Cy3-markierte DNA wurde gespottet, um die obere linke Ecke eines jeden Subarrays identifizieren zu können. Die als Kontrollen gespotteten PCR-Produkte beinhalten hier noch die Vektorsequenz, daher hybridisieren beide Sonden mit ihnen. Markiert ist jeweils nur ein Teil der positiven Spots.

Die Sonden für beta-actin und Cyclophilin ergaben beide ein gutes Signal mit demselben Fingerprint (Kinase A2+ / US6). Dies ermöglichte die Bestimmung des Verhältnisses der Intensitäten der beiden Signale zueinander. Es ergab sich für die meisten Patientenproben ein Verhältnis von etwa 20, die Fibroblasten enthalten also etwa 20x soviel beta-Actin-mRNA wie Cyclophilin-mRNA..

Die Entfernung der in den als Positivkontrollen verwendeten PCR-Produkten enthaltenen Vektorsequenzen mittels Restriktionsverdau erbrachte das gewünschte Ergebnis. In weiteren Hybridisierungsversuchen gaben nur noch die der jeweils verwendeten Sonde entsprechenden PCR-Produkte ein positives Signal.

## 4.9. P53-Mutationsanalysen

### 4.9.1. SSCP

Zunächst wurde die SSCP-Analyse mit den Exons 6 – 8 (Codons 110 – 307) durchgeführt, in denen bis dahin die meisten Mutationen gefunden worden waren. Es wurden jedoch keine Unterschiede im Laufverhalten der PCR-Produkte im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden. Da die bekannten Mutationen in den als Kontrollen mitgeführten Kolonkarzinomzelllinien SW 480 und SW 620 zuverlässig detektiert wurden, konnten methodische Fehler ausgeschlossen werden.

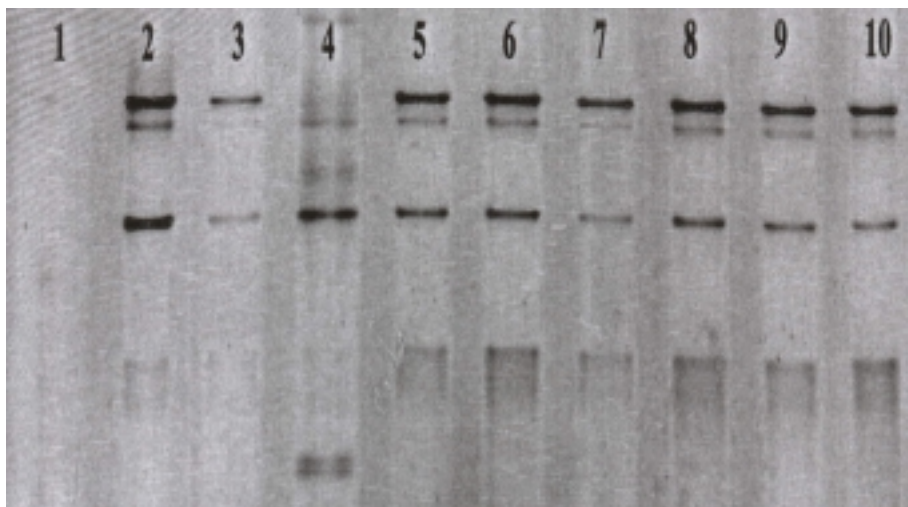


Abbildung 34: SSCP-Analyse von Exon 7 des p53-Gens. 6 verschiedene Fibroblastenpopulationen von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Spuren 5-10) weisen keine Mutation in diesem Gen auf. Spur 4 zeigt das typische Mutationsmuster einer Tumorzelllinie (SW 480) mit einer Punktmutation im Kodon 248. Eine weitere Tumorzelllinie (Spur 3), welche eine Mutation in einem benachbarten Exon trägt (SW 620, Punktmutation im Kodon 273 Exon 8), zeigt ebenfalls kein Mutationsmuster im Exon 7. Spur 2 zeigt das nicht mutierte p53-Gen (gesunde Kontrolle) und Spur 1 die Negativkontrolle der PCR (Weglassen der Taq-Polymerase).

Zusätzlich wurden auch die Exons 2, 3, und 9 untersucht, doch auch hier konnte bei keinem der 10 untersuchten Patienten eine Mutation entdeckt werden. Filme wurden z.T. bis zu 2 Wochen exponiert, um eventuell auftretende schwache zusätzliche Banden zu finden. Solche zusätzlichen Banden wären möglicherweise zu erwarten, wenn nur ein kleiner Teil der Fibroblastenpopulation eine Mutation trägt. Doch auch nach zweiwöchiger Exposition konnten keine weiteren Banden gefunden werden.

Um sicher zu gehen, daß diese Ergebnisse nicht auf mangelnde Sensitivität der Methode zurückzuführen sind, wurden im folgenden 3 weitere Methoden eingesetzt.

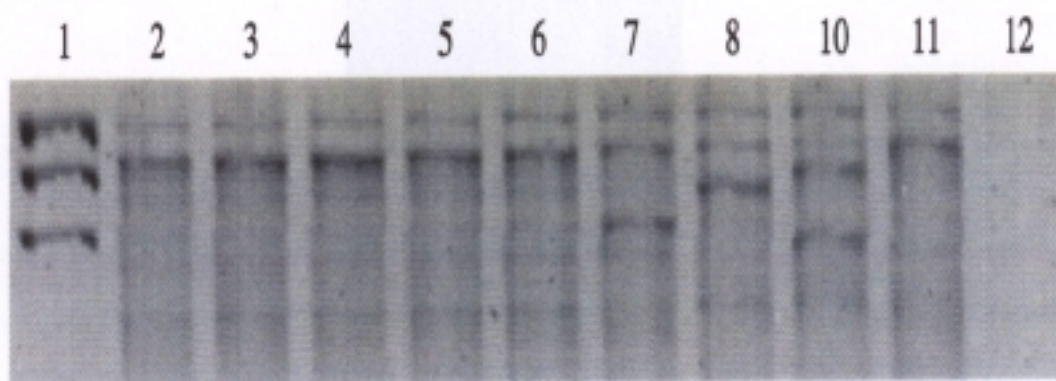


#### 4.9.2. NIRCA

Auch mit dem „nonisotopic RNase cleavage assay“ wurden in den hier untersuchten Exons 5 – 9 keine Mutationen gefunden. Eine detektierte Mutation bei einem Patienten wurde durch Sequenzierung überprüft. Es zeigte sich, daß es sich um eine Punktmutation (G → T) im Intron 7 handelt, die in der SSCP-Gelanalyse nicht gefunden werden konnte, weil dort alle Exons einzeln untersucht wurden. Die Introns wurden somit dort nicht mitamplifiziert.

Das Auffinden dieser Punktmutation sowie die zuverlässige Detektion der bekannten Mutationen in den Zelllinien SW480 und SW620 zeigen, daß auch diese Methode empfindlich und verlässlich ist. Nach Angaben des Herstellers ist eine Mutation, die in 2 – 5 % der untersuchten Zellen vorliegt, hiermit zu identifizieren. Zur weiteren Erhöhung der Sensitivität wurden zur Auftrennung der RNase-verdauten Doppelstrang-RNA ausser den mit SYBRGreen II gefärbten Agarosegelen auch fertige Polyacrylamidgele der Firma Novex verwendet, die mit dem zugehörigen Silberfärbungskit gefärbt wurden. Auch dadurch konnten jedoch keine Mutationen detektiert werden

Weiterhin wurden 3 von Prof. Firestein, San Diego, zur Verfügung gestellte cDNA-Klone mit von ihm gefundenen Mutationen untersucht. Auch diese Mutationen konnten problemlos gezeigt werden.

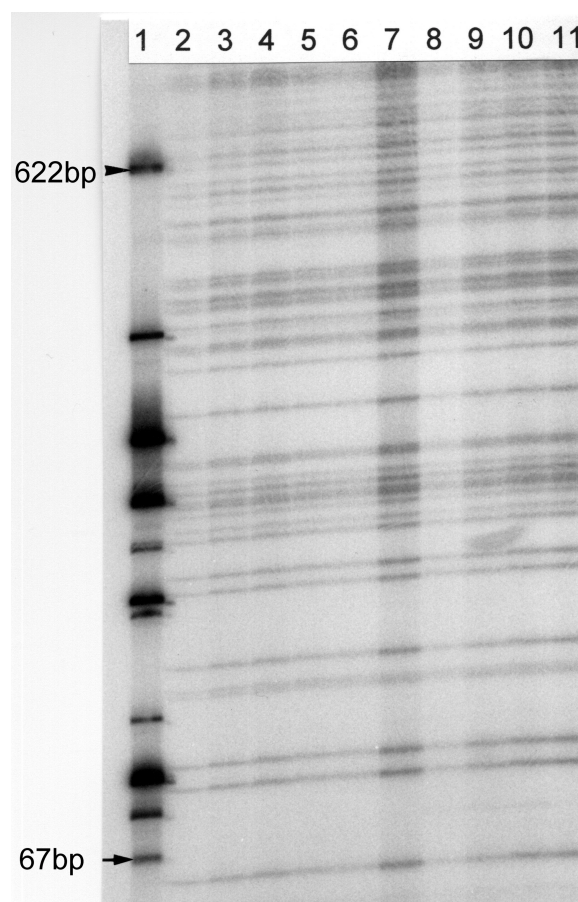


*Abbildung 35: RNA-Mismatchanalyse des p53-Gen im Bereich Exon 7 bis 9. Spur 1 zeigt den DNA-Marker (500, 700 u. 1000 Basenpaare), Spuren 2-6 zeigen verschiedene Fibroblastenpopulationen von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit einem Muster, welches identisch zum normalen p53-Gen ist (Spur 11). Spuren 7, 8, 10 zeigen das Mutationsmuster von 3 verschiedenen Mutationstypen, Spur 7 eine Mutation im Intron, welche in direkter Nähe zum Exon 7 liegt. Spur 8 zeigt die Punktmutation im Kodon 248 im Exon 7 der Tumorzelllinie SW 480 und Spur 10 die Punktmutation im Kodon 372 im Exon 8 der Tumorzelllinie SW 620. Spur 12 zeigt die Negativkontrolle der PCR (Weglassen der Taq-Polymerase).*

#### 4.9.3. BESS T-Scan

Bei diesem Ansatz werden eine Reihe verschieden grosser PCR-Fragmente gebildet, die der „T-Leiter“ bei der konventionellen radioaktiven Sequenzierung entsprechen. Sie werden generiert durch den Einbau limitierender Mengen an dUTP während der PCR und nachfolgende Behandlung der PCR-Produkte mit Uracil-*N*-Glykosylase und Endonuclease IV. Diese Behandlung führt zu einer Spaltung der PCR-Produkte an den (wenigen) Stellen, an denen dUTP anstelle von dTTP eingebaut worden war, und somit zur Entstehung der „T-Leiter“. Das Auftreten oder Verschwinden von Banden sowie Intensitätsveränderungen einzelner Banden bei Patienten-DNA im Vergleich zu gesunden Kontrollen würde hier Mutationen anzeigen.

Auch mit diesem Ansatz konnten keine Mutationen des p53-Gens bei den untersuchten RA-Patienten nachgewiesen werden.



*Abbildung 36: Base Excision Sequence Scanning T-Scan (BESS T-Scan)-Analyse des p53 Gens im Bereich der Exons 4-7. Es zeigt ein identisches, nicht mutiertes Bandenmuster in allen Fibroblastenpopulationen der Patienten mit rheumatoider Arthritis (Spuren 2-11). Spur 1 zeigt den DNA-Größenstandard.*



#### 4.9.4. Direktsequenzierung

Die Direktsequenzierung der Exons 6-9, die den grössten Teil der bekannten Mutationen enthalten, von 10 Patienten sowie der Exons 2-5 und 10 von 8 Patienten zeigte ebenfalls in allen Fällen eine hundertprozentige Übereinstimmung der erhaltenen Sequenzen mit der veröffentlichten p53-Gensequenz (Genbank accession number: U94788). Auch die Sequenzierung der p53-Promotorregion ergab keinerlei Veränderung der Sequenz bei RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

## 5. Diskussion

### 5.1. RAP-PCR

Die 1990 von Welsh und McClelland erstmals beschriebene Methode der „arbitrarily primed PCR“ (Welsh & McClelland, 1990) wurde in den folgenden Jahren von diesen und weiteren Autoren variiert und verbessert, vor allem wurde ihr Einsatz auch auf die Untersuchung der differentiellen Genexpression auf RNA-Ebene ausgedehnt (Liang & Pardee, 1992; Welsh *et al*, 1992).

Diese Verfahren haben vielfach ihre Effizienz und Zuverlässigkeit bei der Untersuchung differentieller Genexpressionsmuster unter Beweis gestellt. Obwohl bisher vor allem Krebserkrankungen untersucht wurden (Liang *et al*, 1992; Shinoura *et al*, 1995; Yeatman & Mao, 1995) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sich die RAP-PCR, ebenso wie verwandte Methoden wie subtraktive Hybridisierung (Seki *et al*, 1998) und differential display (Mangasser-Stephan *et al*, 1997), sehr gut eignet, um die differentielle Genexpression in Fibroblasten aus rheumatoidem Synovium zu untersuchen. Auch bei anderen Fragestellungen zeigte sich, daß die RAP-PCR ebenso gute oder gar bessere Ergebnisse als die „Konkurrenzmethoden“ liefert (Miller *et al*, 1999). Im Vergleich zu dem nahe verwandten differential display liefert die RAP-PCR einen höheren Anteil an kodierenden mRNA-Anteilen, sog. offenen Leserahmen („open reading frames“, ORF), da hier schon bei der reversen Transkription arbiträre Primer verwendet werden, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit innerhalb des Leserahmens liegen (McClelland *et al*, 1995). Die Verwendung sogenannter „verankerter“ oligo-dT-Primer beim differential display (Liang *et al*, 1992; Liang *et al*, 1994) führt hingegen zu einer vermehrten Amplifikation 3'-untranslatierter Bereiche, die eine grössere Variabilität und somit einen geringeren Informationsgehalt aufweisen.

Die Möglichkeit, RNA-Populationen mehrerer Patienten miteinander zu vergleichen, ist ein Hauptgrund, warum in dieser Arbeit die RAP-PCR als Methode gewählt wurde. Es zeigt sich immer wieder, daß die RA eine relativ heterogene Erkrankung ist, bei der die Ausprägung der Expression bestimmter Gene sich durchaus von Patient zu Patient unterscheiden kann. Methoden wie die subtraktive Hybridisierung, die nur den Vergleich zweier RNA-Populationen ermöglicht, bergen hier die Gefahr, Gene zu isolieren, die lediglich bei dem gewählten Patienten, nicht jedoch bei der Mehrheit der RA-Patienten, differentiell exprimiert sind (Seki *et al*, 1998). Auch ist hier, bedingt durch die Notwendigkeit der erschöpfenden Hybridisierung von Tester und Driver, das Auffinden von Expressionsunterschieden, die nicht dem Alles-oder-Nichts-Prinzip gehorchen, eher unwahrscheinlich. Auch im Vergleich mit den ebenfalls

zur Untersuchung von Expressionsunterschieden eingesetzten cDNA-Arrays bietet die RAP-PCR diverse Vorteile: sie ist nicht auf wenige hundert Sequenzen beschränkt, sondern ermöglicht theoretisch die Identifizierung aller differentiell regulierten mRNAs. Auch besteht bei der RAP-PCR aufgrund des sogenannten  $C_0t$ -Effektes (Mathieu-Daude *et al.*, 1996a) eine höhere Wahrscheinlichkeit, mRNAs zu identifizieren, die nur in geringen Mengen exprimiert werden. Ein weiterer Vorteil war die relativ geringe Menge an benötigter RNA, da aufgrund der Beschränkung auf Zellen aus den ersten fünf Passagen nur beschränkte Mengen an RNA zur Verfügung standen.

Es zeigte sich auch hier, ebenso wie bei anderen Arbeitsgruppen (Tortola *et al.*, 1998), daß die RAP-PCR relativ unempfindlich gegen Variationen in der RNA-Konzentration sowie gegen DNA-Verunreinigungen ist. Wichtig ist hingegen die Qualität der verwendeten RNA, degradiertes Ausgangsmaterial führt zu veränderten Expressionsmustern, die jedoch anhand der Abnahme grösserer Banden leicht identifiziert werden können.

## 5.2. CENP-E

Die erste mRNA, die als differentiell reguliert identifiziert wurde, kodiert für ein kinesin-ähnliches Motorprotein namens CENP-E (Zentromerprotein E). Dieses Protein wurde erstmals 1991 von Yen und Mitarbeitern beschrieben (Yen *et al.*, 1991). Es gehört zur Familie der Zentromer-assoziierten Proteine, von denen bisher insgesamt sechs beschrieben wurden (CENP-A bis CENP-F). Die vollständige CENP-E-mRNA kodiert für 2663 Aminosäuren, die ein Protein mit einem Molekulargewicht von 312 kDa bilden. CENP-E ist ein Bestandteil des menschlichen Zentromer-Kinetochor-Komplexes (Yen *et al.*, 1992). Es fungiert als Kinetochormotor, der sich in der G2-Phase des Zellzyklus transient am Zentromer anlagert, bevor die Mitose beginnt, und offensichtlich an der Chromosomenbewegung und der Verlängerung des Spindelapparates beteiligt ist. Nach Vollendung der Mitose wird CENP-E abgebaut (Brown *et al.*, 1994;Cooke *et al.*, 1997;Thrower *et al.*, 1995;Thrower *et al.*, 1996;Yen *et al.*, 1992). In Übereinstimmung mit dieser vermuteten Funktion führt die Applikation von CENP-E-spezifischen Antikörpern zu einem Wachstumsstop in der Metaphase (Yen *et al.*, 1992). Weiterhin wurde gezeigt, daß kinesin-ähnliche Proteine, inklusive CENP-E, spezifisch den Auf- und Abbau von Mikrotubuli und die darauf folgende Bewegung der Chromosomen zu den Zellpolen während der Mitose regulieren. Sie sind daher essentiell für die Zellteilung (Lombillo *et al.*, 1995). Eine Studie, bei der versucht wurde, die Teilungsrate von Krebszellen durch Hemmung von k-ras mittels Farnesyltransferaseinhibitoren zu vermindern, erbrachte das Ergebnis, daß der wachstumshemmende Effekt dieser Agenzien mehr auf der Unterbin-

dung der Farnesylierung von CENP-E als auf der Hemmung von k-ras beruht (Cox, 2001). Auch dies zeigt die Bedeutung von CENP-E im Zellzyklus und weist auf therapeutisch einsetzbare Mechanismen hin.

Das Vorhandensein oder die Überexpression von CENP-E wurden bisher nicht mit dem Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht, obwohl Antikörper gegen Zentromerproteine regelmässig bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen gefunden werden (von Muhlen & Tan, 1995). Auch wurde CENP-E als Autoantigen bei der limitierten Form der Sklerodermie beschrieben (Rattner *et al*, 1996), einer weiteren Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis.

Obwohl also eine vermehrte Expression von CENP-E auf eine höhere Wachstumsrate der rheumatoiden Synovialfibroblasten hinweisen würde, zeigte sich eine solche vermehrte Proliferation weder in unseren Versuchen noch in den Versuchen anderer Gruppen (Aicher *et al*, 1994). Die Expression von CENP-E ist offensichtlich unabhängig von der Medikation der Patienten, aus denen die untersuchten Fibroblasten gewonnen wurden, und lässt sich auch durch die Gabe von Prednisolon in Kultur nicht beeinflussen.

Obwohl die funktionelle Bedeutung der CENP-E-Überexpression in kultivierten synovialen RA-Fibroblasten derzeit noch unklar ist, ist die Wirkung von CENP-E als Autoantigen analog zur Sklerodermie vorstellbar. Auch vermehrtes Wachstum der Fibroblasten an der Invasionszone ist eine mögliche Erklärung für die CENP-E-Überexpression. Da diese Zellen nur einen geringen Teil der kultivierten Fibroblasten ausmachen, ist eine schnellere Wachstumsrate dieser Subpopulation möglicherweise mit den hier verwendeten Methoden nicht detektierbar.

### 5.3. SDF 1

Chemokine stellen die größte Familie unter den Cytokinen mit mehr als 50 verschiedenen Molekülen, die an mindestens 16 verschiedene Rezeptoren binden (Baggiolini *et al*, 1997;Baggiolini, 1998). Ursprünglich wurden Chemokine als Entzündungsmediatoren klassifiziert, es wird jedoch langsam klar, daß sie an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind, wie Entzündung, Tumorgenese, Hämatopoiese, Embryogenese und HIV-Infektionen (Baird *et al*, 1999;Hesselgesser & Horuk, 1999;Sallusto *et al*, 1998). Viele dieser Funktionen werden bisher noch kaum verstanden.

Daß Chemokine auch von Fibroblasten produziert werden ist bekannt, ebenso weiß man, daß deren Menge stark variiert, was wahrscheinlich interindividuelle Unterschiede bezüglich des physiologischen und immunologischen Status reflektiert (Brouty-Boye *et al*, 2000). Auch

der pathologische Zustand des Gewebes, aus dem diese Fibroblasten isoliert wurden, bedingt Unterschiede in der Chemokinproduktion.

SDF1 gehört zur Gruppe der CXC-Chemokine. Das Protein hat eine Grösse von 8 kD, das zugehörige Gen liegt auf Chromosom 10q, im Unterschied zu den meisten anderen Genen, die für Chemokine kodieren. Diese befinden sich in einem Cluster auf Chromosom 4q. SDF1 ist hochkonserviert zwischen verschiedenen Spezies, humanes und murines SDF1 unterscheiden sich lediglich in einer einzigen Aminosäure (Shirozu *et al*, 1995). Es existieren 2 Spleissvarianten, SDF1 $\beta$  besitzt 4 zusätzliche Aminosäuren am Carboxylende. Es wurden aber bisher keine Unterschiede hinsichtlich Regulation oder Funktion dieser beiden Varianten identifiziert.

SDF1 wurde ursprünglich als ein Faktor isoliert, der das Wachstum von prä-B-Zellen stimuliert (Nagasawa *et al*, 1994; Tashiro *et al*, 1993). Mittlerweile ist jedoch ein breites Spektrum von Funktionen bekannt. So wirkt SDF1 nicht nur chemotaktisch auf T-Lymphozyten (Bleul *et al*, 1996a), sondern auch auf CD34-positive hämatopoetische Vorläuferzellen (Aiuti *et al*, 1997; Mohle *et al*, 1998) sowie B-Zell- und Megakaryozytenvorläuferzellen (Bleul *et al*, 1998; Hamada *et al*, 1998). Auch die Proliferation von Astrozyten (Bajetto *et al*, 2001) sowie die Migration von Microgliazellen im Gehirn wird über SDF1 reguliert (Tanabe *et al*, 1997). Der Rezeptor für SDF1 wird als CXCR4 (CXC - Chemokinrezeptor 4) bezeichnet. CXCR4 ist, ebenso wie alle weiteren bisher bekannten Chemokinrezeptoren, ein G-Proteingekoppelter Rezeptor mit 7 Transmembrandomänen (Bleul *et al*, 1996b). Die Bindung von SDF1 an CXCR4 erfolgt in 2 Stufen: zunächst interagiert die N-terminale Region von CXCR4 mit den Aminosäuren 12-17 von SDF1. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, was eine Bindung des N-terminalen Endes von SDF1 an weitere Regionen von CXCR4 ermöglicht. Erst diese 2. Bindung führt zu einem Signal (Gupta *et al*, 2001).

Knockoutmäuse, bei denen entweder SDF1 oder CXCR4 nicht exprimiert wird, zeigen beide ein sehr ähnliches Bild. Beide sterben spätestens eine Stunde nach der Geburt, haben ein disorganisiertes Cerebellum, Blutungen in den Nieren, eine kollabierte Lunge sowie weder Myelopoiese noch B-Zell-Lymphopoiese (Ma *et al*, 1998). Auch dies zeigt zum einen, daß die Interaktion von SDF1 mit CXCR4 spezifisch ist, zum anderen zeigen diese Versuche auch die Vielzahl der Funktionen, die SDF1 schon in der Embryogenese wahrnimmt.

SDF1 wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert, fehlt aber in den meisten Krebszelllinien ebenso wie in prämaligen Colonadenomen, was auf eine Rolle in der frühen Tumorgenese, eventuell als Tumorsuppressor, hindeutet (Begum *et al*, 1996). Bei Brustkrebs wurde allerdings vor kurzem eine mögliche Rolle von SDF1 bei der Metastasierung beschrieben (Muller

*et al*, 2001), auch bei Pankreaskarzinomen wird eine Beteiligung von SDF1 diskutiert (Koshiba *et al*, 2000). Bei chronischen Entzündungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wurde keine Korrelation der SDF1-Expression mit den Entzündungsparametern gefunden, wie sie für andere Chemokine, wie z.B. Interleukin 8, gezeigt werden konnte (Katsuta *et al*, 2000). Die Unterdrückung der Signalübertragung über SDF1 in der allergischen Lungenentzündung bei Mäusen erbrachte allerdings eine deutliche Besserung der Entzündung (Gonzalo *et al*, 2000).

Es gibt viele Hinweise, daß SDF1 zum chronisch-inflammatorischen Prozess im rheumatoiden Synovium beitragen kann. So hat es Anteil an der Angiogenese (Mirshahi *et al*, 2000; Salcedo *et al*, 1999), ein Prozess, der unter anderem von VEGF (vascular endothelial growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor) reguliert wird. bFGF findet sich vermehrt in hyperplastischem Synovium und an der Übergangszone von Synovium und Knorpel (Qu *et al*, 1995).

Ebenso kann die gezielte Einwanderung von T-Zellen durch SDF1 vermittelt werden, selbst wenn dieses nicht in freier Form, sondern gebunden an Fibronectin vorliegt (Pelletier *et al*, 2000). Die Bindung dieser T-Zellen an die extrazelluläre Matrix und somit ihr Verbleib im Synovium können sodann von TNF $\alpha$ , einem proinflammatorischen Zytokin, welches ebenfalls vermehrt im rheumatoiden Synovium auftritt, verstärkt werden (Franitza *et al*, 2000; Klimiuk *et al*, 2001). Diese und andere Versuche zeigen, daß SDF1 sicher nicht der einzige Faktor ist, der die chronisch-progrediente Entzündung im RA-Synovium bedingt, vielmehr handelt es sich wohl um ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Moleküle. Dies wurde auch für andere entzündliche Erkrankungen wie die allergische Lungenentzündung bei Mäusen postuliert (Gonzalo *et al*, 2000). In diesem Modell bewirkte die Blockade der Interaktion von SDF mit seinem Rezeptor durch Administration von anti-SDF1- bzw. anti-CXCR4-Antikörpern eine deutliche Reduzierung der Entzündung, obwohl SDF1 auch in der Lunge gesunder Tiere exprimiert wird.

Im rheumatoiden Synovium finden sich sehr viel mehr Makrophagen als im gesunden Synovium (Firestein GS, 1998). Da SDF1 auf Monozyten/ Makrophagen stark chemotaktisch wirkt (Bleul *et al*, 1996a), besteht auch die Möglichkeit, daß diese Makrophagen durch von Fibroblasten produziertes SDF1 angezogen werden.

Für die Chemotaxisversuche wurden PBMCs aus peripherem Blut verwendet. Da diese, wie vor kurzem gezeigt wurde, bei gesunden Probanden ähnliche Mengen an CXCR4 exprimieren können wie bei RA-Patienten (Nanki *et al*, 2000), spiegeln die unterschiedlichen Wanderungsraten individuelle Unterschiede wider. Es bleibt jedoch festzuhalten, daß PBMCs aus

dem Blut von RA-Patienten generell mehr auf SDF1 wanderten als Kontrollzellen aus dem Blut gesunder Probanden. Auch dies weist auf eine Beteiligung von SDF1 an der Pathophysiologie der RA hin.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß auch synoviale Fibroblasten in Chemotaxisversuchen eine deutliche Wanderung zeigen. Zur Auslösung dieser Wanderung ist jedoch ein komplexes Gemisch verschiedener Substanzen notwendig, das die Fibroblasten selbst erzeugen, das sog. konditionierte Medium. Serumfreies Medium mit SDF1 allein genügt nicht, um Chemotaxis bei Fibroblasten auszulösen. Wird SDF1 konditioniertem Medium zugesetzt, erhöht dies jedoch bei einem Teil der Patienten die Zahl der wandernden Zellen, bei anderen zeigt sich kein additiver Effekt. Auch dies zeigt wiederum, daß die Vorgänge im rheumatoiden Synovium, ebenso wie auch bei der Osteoarthritis (Martel-Pelletier *et al*, 1999), durch ein komplexes Netzwerk verschiedener sich gegenseitig beeinflussender Substanzen gesteuert werden, deren jeweilige Konzentration im Zusammenwirken unterschiedliche Einflüsse haben kann. So wurde für SDF1 von Poznansky und Mitarbeitern (Poznansky *et al*, 2000) gezeigt, daß T-Lymphozyten von niedrigen Konzentrationen (100 ng/ ml) angezogen, von höheren Konzentrationen (1µg/ ml) jedoch abgestossen werden.

Die Tatsache, daß synoviale Fibroblasten chemotaktisches Verhalten auf selbstproduzierte Substanzen zeigen, ist an sich schon bemerkenswert und trägt möglicherweise dazu bei, die Frage zu entscheiden, ob die Hyperplasie im rheumatoiden Synovium durch Zellteilung oder Einwanderung hervorgerufen wird. Da im RA-Synovium nur wenige sich teilende Zellen gefunden werden (Firestein GS, 1998;Lalor *et al*, 1987), ist eine durch chemotaktische Substanzen wie SDF1 gesteuerte Einwanderung von Fibroblasten sehr wahrscheinlich.

Es wird gemeinhin angenommen, daß der hauptsächliche Unterschied zwischen rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis darin besteht, daß bei der Osteoarthritis keine primär entzündliche Erkrankung vorliegt. Die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße im inflammatorischen Milieu der RA andererseits ermöglicht erst den vermehrten Zustrom von Zellen und Molekülen, die zum charakteristischen Bild der RA führen. Das bei der RA vermehrt produzierte TNF $\alpha$  spielt hier wohl eine grosse Rolle, sowohl was die Aufrechterhaltung der Entzündung betrifft, als auch bezüglich der auch durch SDF1 vermittelten Einwanderung von T-Lymphozyten (Franitza *et al*, 2000;Maini & Taylor, 2000) und anderen Effektorzellen. Auch bei der OA spielen, wie in den letzten Jahren immer deutlicher wird, Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL1 eine Rolle, diese werden dort jedoch in geringeren Mengen produziert (Martel-Pelletier *et al*, 1999).

Wenn man davon ausgeht, daß SDF1 zur Entzündung im rheumatoiden Synovium durch Chemoattraktion von T-Lymphozyten und Monozyten sowie zur Hyperplasie durch Attraktion von Fibroblasten beiträgt, erklärt sich auch der positive Einfluss von Steroiden auf diese Entzündung durch Herunterregulierung sowohl der SDF1- als auch der CXCR4-Expression in synovialen Fibroblasten. Dabei erfolgt die Herunterregulierung der Expression des Rezeptors abhängig von der Steroiddosis sehr schnell, die Herunterregulierung der Expression des Chemokins sehr nachhaltig, da sie auch nach mehreren Passagen in Kultur noch nachweisbar ist.

Es konnte gezeigt werden, daß SDF1 sowohl in kultivierten Fibroblasten als auch im Synovialgewebe von RA- sowie OA-Patienten vermehrt exprimiert wird. Die unterschiedlich starke Expression lässt sich möglicherweise auch durch die Dosis an Steroiden, mit denen die Patienten behandelt wurden, erklären. OA-Patienten, die im allgemeinen keine Steroide erhalten, weisen eine deutlich höhere SDF1-Expression auf als RA-Patienten, bei denen eine Abhängigkeit von der Dosierung deutlich wurde.

Die Hochregulierung von SDF1 ist vermutlich nicht spezifisch für die rheumatoide Arthritis, kann jedoch im Zusammenwirken mit anderen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IL1 zum Krankheitsbild der RA beitragen.

#### **5.4. Lasermikrodissektion und RAP-PCR**

Ein Hauptproblem bei der Arbeit mit Fibroblasten, die aus Synovium gewonnen werden, ist, daß es keine Möglichkeit gibt, festzustellen, aus welchem Bereich des Synoviums die kultivierten Zellen stammen. Man wird zwar bei der Gewebeaufarbeitung immer versuchen, möglichst nur den lining layer zu erhalten, da dieser besonders interessante Bereich jedoch selbst im hyperplastischen RA-Synovium selten mehr als 10 Zellschichten dick ist, wird man immer auch grössere Bereiche des sublinings erhalten. Die Methode der Wahl, um dieses Problem zu umgehen, ist die Verbindung von Lasermikrodissektion und RAP-PCR, da damit ganz gezielt z.B. der Bereich isoliert werden kann, in dem das Synovium den Knorpel invadiert. Da die hierbei gewonnene RNA-Menge sehr gering ist, ist eine Amplifikation notwendig. In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, daß die RAP-PCR hierfür sehr geeignet ist. Da jeweils alle 5 sequenzierten Klone, die aus einer Bande im SSCP-Gel gewonnen wurden, dieselbe Sequenz beinhalten, kann davon ausgegangen werden, daß die identifizierten Gene tatsächlich differentiell exprimiert werden.

Die Bestätigung dieser differentiellen Expression mittels in situ-Hybridisierung wurde bereits durchgeführt. Für alle drei gefundenen Gene konnte die Verteilung, die in den RAP-PCR-Versuchen gefunden wurde, bestätigt werden. Für Thrombospondin 4 wurde auch bereits eine



immunhistochemische Färbung durchgeführt. Sowohl RNA als auch Protein fanden sich in einigen Bereichen des Synoviums konzentriert, in anderen Bereichen wurde kein Signal erhalten. Da über die Funktion von Thrombospondin 4 bisher wenig bekannt ist, können hierzu noch keine weiteren Aussagen getroffen werden.

Fibronectin ist hingegen gut untersucht, es handelt sich hierbei um einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix, der von synovialen Fibroblasten produziert wird (Iwanaga *et al*, 2000). Wie auch in unseren Versuchen gefunden wurde, wird Fibronectin hauptsächlich von den Fibroblasten der synovialen Deckzellschicht erzeugt (Berndt *et al*, 1998; Hino *et al*, 1995; Nikkari *et al*, 1995; Waller *et al*, 1992). Dies bestätigt nochmals die Zuverlässigkeit unserer Methode.

Über das dritte bisher als differentiell exprimiert identifizierte Gen ist ebenfalls wenig bekannt, es wird jedoch vermutet, daß Ciz1 ( $p^{21 \text{ Waf1}}$  interacting zinc finger protein) an der Hemmung der Apoptose durch im Zytoplasma lokalisiertes  $p^{21 \text{ Waf1}}$  beteiligt ist (Mitsui *et al*, 1999).  $p^{21 \text{ Waf1}}$  befindet sich normalerweise im Zellkern, wo es an der durch p53 bedingten Hemmung der Zellteilung nach dem Auftreten von DNA-Schäden beteiligt sein soll. Befindet sich  $p^{21 \text{ Waf1}}$  jedoch im Zytoplasma, kann es auch antiapoptotisch wirken (Asada *et al*, 1999). Da eine Hemmung der Apoptose auch als einer der pathophysiologischen Mechanismen im RA-Synovium diskutiert wird (Aupperle *et al*, 1998), könnte Ciz1 hierbei durchaus eine Rolle spielen. Die Überexpression von  $p^{21 \text{ Waf1}}$  als Therapieansatz für die rheumatoide Arthritis wurde auch im Modell bereits erfolgreich erprobt (Nonomura *et al*, 2001), auch hier könnte die Wechselwirkung mit Ciz1 von Interesse sein.

## 5.5. RAP-PCR-Mikroarrays

Das am Sidney Kimmel Cancer Center (SKCC) in San Diego durchgeführte Mikroarrayprojekt verlief erfolgreich, die grundlegenden methodischen Probleme konnten gelöst werden. Sowohl die Bedingungen für das Aufbringen der DNA auf die Objektträger als auch für die Herstellung geeigneter Sonden und die Hybridisierung dieser Sonden mit den Arrays wurden soweit optimiert, daß reproduzierbare Signale mit sehr wenig unspezifischem Hintergrund erhalten wurden. Auch konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, von als Probe gespotteten RAP-PCR-Produkten ein spezifisches Hybridisierungssignal zu erhalten. Es bestehen allerdings noch einige Fragen, die der Klärung bedürfen:

Zum einen ist noch nicht bekannt, wieviele verschiedene RAP-PCR-Reaktionen notwendig sind, um alle oder auch nur den grössten Teil der jeweils in einer Zelle exprimierten mRNAs abzudecken. Hier ist auch vorstellbar, in jedem PCR-Ansatz mehr als einen Primer zu ver-

wenden. Dies würde zu einer Erhöhung der Zahl der jeweils entstehenden Produkte führen, wirft aber auch weitere Probleme auf. Bedingt durch das geringe Volumen, das bei diesem Verfahren pro spot auf den Objektträger aufgebracht wird (ca. 10 nl), ist jedes einzelne PCR-Produkt nur in sehr geringer Zahl vorhanden. Eine Erhöhung der Anzahl der Produkte würde somit die Kopienzahl jedes einzelnen Produktes und damit die Sensitivität des Arrays weiter verringern. Dem kann bis zu einem gewissen Grad durch Erhöhung der DNA-Konzentration in der aufzubringenden Lösung abgeholfen werden.

Bei Verwendung mehrerer Primer würde auch die durchschnittliche Größe der entstehenden Produkte sinken, was die Spezifität verringert. Auch ein weiterer hier sehr erwünschter Effekt der RAP-PCR, die bevorzugte Amplifikation seltener mRNAs (Mathieu-Daude *et al*, 1996a), würde dann wohl geringer ausfallen. Die optimale Anzahl an Primern und verschiedenen Reaktionen muss daher noch experimentell bestimmt werden.

Auch eine geeignete Kontrolle muss noch etabliert werden. In den hier beschriebenen Versuchen wurden mehrere sog. housekeeping-Gene verwendet. Diese hybridisieren jedoch selbst auch jeweils nur mit wenigen verschiedenen Fingerprints. Ideal wäre jedoch eine Kontrolle, die mit jedem beliebigen Fingerprint ein Signal ergibt. Dadurch könnte die Expression eines interessierenden Gens jeweils als Verhältnis der Signalintensitäten von genspezifischer Sonde (markiert mit Cy3) und Kontrolle (markiert mit Cy5 oder umgekehrt) bestimmt werden, wie es in einem Fall (beta-Actin – Cyclophilin) gezeigt werden konnte. Unterschiede in der Menge an gespotteter DNA würden somit eine geringere Rolle spielen (diese Unterschiede sollten trotzdem möglichst gering ausfallen, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten). Eine Sonde von mittlerer Komplexität wie ein von den untersuchten Proben unabhängiger Fingerprint, ein Pool von housekeeping-Genen oder auch *Alu*-Sequenzen erscheint hier erfolgversprechend.

Diese Fragestellungen werden derzeit von Dr. R. Risques am SKCC in Fortführung der oben beschriebenen Versuche untersucht. Nach Klärung dieser Fragen wird mit den RAP-PCR-Mikroarrays eine sehr vielfältig einsetzbare Methode zur Verfügung stehen.

## 5.6. p53-Mutationsanalysen

Funktionelles p53-Protein besteht aus 393 Aminosäuren mit 3 Schlüsseldomänen (Vogelstein & Kinzler, 1992). Die bei verschiedenen Arten von Krebs bisher identifizierten Mutationen befinden sich zumeist in den DNA-bindenden Domänen. Über 20% aller bekannten p53-Mutationen (Hainaut *et al*, 1998) lassen sich 5 sog. „hot spots“ zuordnen, die Gesamtzahl bekannter Mutationen nimmt stetig zu (Beroud & Soussi, 1998; Hainaut *et al*, 1998; Hollstein *et al*, 1996). Häufig verringern diese Mutationen die DNA-Bindungsfähigkeit von p53, was zu

einer geringeren Proliferationshemmung und damit zur klonalen Vermehrung maligner Zellen führen kann (Harris & Hollstein, 1993). Obwohl wenig bekannt ist über die pathophysiologischen Konsequenzen, die die An- oder Abwesenheit von p53-Mutationen bei nichtmalignen und Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis und systemischem Lupus erythematoses wie auch bei Chromosomeninstabilitätssyndromen hat (Kovacs B *et al*, 1996; Lu & Lane, 1993; Moles *et al*, 1993), kann man doch spekulieren, daß eine beeinträchtigte Funktion von p53 beiträgt zu nichtmalignen chronisch entzündlichen und Autoimmunprozessen, indem sie die Lebensspanne aberranter immunkompetenter Zellen verlängert (Dolcetti & Boiocchi, 1996; Mountz *et al*, 1994). Neuere Studien konnten die Anwesenheit von p53-Antigen in RA-Synovialgewebe zeigen (Firestein *et al*, 1996); 2 Arbeitsgruppen haben auch das Vorkommen verschiedener Mutationen innerhalb des p53-Gens, insbesondere in „hot spots“, in RA-Synovia beschrieben (Firestein *et al*, 1997; Reme *et al*, 1998). Es ist daher vorstellbar, daß der Verlust des proliferationshemmenden Potentials von p53 auch zur Proliferation des RA-Synoviums beitragen könnte (Han *et al*, 1999).

Bei der rheumatoiden Arthritis zeigen transformiert erscheinende synoviale Fibroblasten, insbesondere im Bereich des invasiven Pannus, einige Eigenschaften, die auch von invasiv wachsenden Zellen aus malignen Tumoren bekannt sind. Unter anderem zeigen sie eine Hochregulierung verschiedener Proto-Onkogene und apoptoseinhibierender Moleküle (Müller-Ladner *et al*, 1996), produzieren matrixabbauende Enzyme (Sun *et al*, 1998), und sind möglicherweise (dys-)reguliert durch p53-abhängige Mechanismen, die ebenso auch in neoplastischen Zelllinien aktiv sind (Mangasser-Stephan *et al*, 1997; Müller-Ladner *et al*, 1995; Müller-Ladner *et al*, 1996; Seignani *et al*, 1998; Sun *et al*, 1998). Sie behalten ihr zerstörerisches Potential sogar bei, wenn sie für längere Zeit zusammen mit humanem Knorpel in SCID-Mäuse transplantiert werden (Müller-Ladner *et al*, 1996).

Da bisher wenig über das Auftreten von p53-Mutationen im Genom von RA-Synovialfibroblasten bekannt war (Firestein *et al*, 1997; Reme *et al*, 1998), untersuchten wir das p53-Gen bei synovialen Fibroblasten von 10 verschiedenen Patienten mit schwerer rheumatoider Arthritis. Es wurden hierzu 4 verschiedene Methoden verwendet:

Die SSCP-Gelanalyse basiert auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von DNA-Einzelsträngen gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenz, auf nichtdenaturierenden Polyacrylamidgelen (Orita *et al*, 1989; Sheffield *et al*, 1993). Obwohl in den letzten Jahren verschiedene andere Methoden zur Mutationsanalyse entwickelt wurden, gilt die SSCP-Analyse doch immer noch als Goldstandard, ob sie nun radioaktiv oder nicht radioaktiv ausgeführt wird (Bosari *et al*, 1995). SSCP-Mutationsanalysen sind geeignet zur Untersuchung maligner

Erkrankungen (Hainaut *et al*, 1998;Kang *et al*, 1998;Lavarino *et al*, 1998;Shi *et al*, 1996;van Rensburg *et al*, 1998), ob es sich nun um Krebserkrankungen mit hoher (Wang *et al*, 1998) oder niedriger (Yagi *et al*, 1998) p53-Mutationsfrequenz handelt. Ebenso eignet sich dieses Verfahren auch zur Untersuchung nichtmaligner Erkrankungen, es erreicht hier sogar eine Sensitivität von 100% (Clark *et al*, 1995;Puck *et al*, 1997).

Auch das NIRCA-Verfahren, die nichtradioaktive RNase-Spaltungsanalyse (Hawkins & Hoffman, 1997), ist ein sehr sensitives Verfahren, mit dem Mutationen detektiert werden können, die in nur 2 - 5% der untersuchten Zellen auftreten. Unspezifische Spaltprodukte, die aber auch bei den gesunden Kontrollen auftreten, zeigen sich manchmal in sog. hypersensitiven Bereichen. Diese Produkte weisen nicht auf Mutationen hin.

Das dritte verwendete Verfahren, das sogenannte BESS-T-Scan, ist zwar weniger sensitiv, da damit keine G→C- und C→G-Punktmutationen detektiert werden können. Diese Mutation trägt allerdings auch nur etwa 10% zu allen bekannten Mutationen bei.

Wir fanden mit keiner dieser Methoden eine relevante Mutation des p53-Gens in einer der untersuchten Fibroblastenpopulationen. Das zeigt, daß p53-Mutationen nicht zum proliferativen und aggressiven Phänotyp dieser Zellen beitragen. Dieser Befund steht im Kontrast zu früheren Studien, in denen verschiedene p53-Mutationen in synovialen RA-Fibroblasten auf RNA-Ebene beschrieben wurden (Firestein *et al*, 1997;Reme *et al*, 1998). Die Untersuchung der klonierten p53-Sequenzen, die uns Prof. Firestein von der Abteilung für Rheumatologie der Universität von Kalifornien in San Diego zur Verfügung stellte, mit den oben beschriebenen Verfahren zeigte die Zuverlässigkeit unserer Methoden, da alle beschriebenen Mutationen gefunden wurden. Dies lässt vermuten, daß das vereinzelte Auftreten mutierter p53-RNA-Transkripte im rheumatoidem Synovium nicht durch Mutationen im Genom eines grösseren Anteils der synovialen Fibroblasten bedingt ist. p53-Mutationen tragen daher nicht substantiell zum Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis bei.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Genen und Genprodukten, die für die Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis von Bedeutung sind. Zu diesem Zweck wurden zum einen Synovialgewebe von mehr als 200 RA- und OA-Patienten sowie weiteren Kontrollen asserviert. Sowohl eingefrorene Gewebeproben als auch aus den Geweben gewonnene synoviale Fibroblasten sowie daraus isolierte RNA und DNA bilden die Basis, die diese und zukünftige Arbeiten erst ermöglicht. Zum anderen wurde eine Vielfalt an Methoden für die Anwendung mit diesen Proben etabliert oder neu entwickelt, die es gestatten, sowohl auf DNA-Ebene (Mutationsanalysen) als auch auf Ebene der RNA (RAP-PCR, in situ-Hybridisierung, RAP-PCR-Mikroarrays, MOMeNT) RA-spezifische Unterschiede zu identifizieren. Mittels der ebenfalls eingesetzten Immunhisto- und Zytochemie konnten diese Unterschiede auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Genexpression synovialer Fibroblasten im Vergleich zwischen rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis. Hierzu wurde zunächst RNA aus kultivierten Zellen isoliert, nachfolgend wurden mit Hilfe der RAP-PCR „Fingerabdrücke“ erstellt, die es ermöglichten, differentiell exprimierte Gene anhand der amplifizierten Sequenzen zu identifizieren. Hiermit gefundene Unterschiede wurden sowohl anhand der isolierten Fibroblasten-RNA (mittels semiquantitativer RT-PCR und realtime-PCR) als auch anhand der synovialen Gewebeproben (mittels in situ-Hybridisierung und Immunhistochemie) bestätigt. Es konnte hierbei gezeigt werden, daß diese Vorgehensweise zur Untersuchung der differentiellen Genexpression bei der rheumatoiden Arthritis sehr gut geeignet ist.

Bei diesen Versuchen zeigte sich weiterhin, daß die Anzahl der so identifizierbaren Unterschiede wesentlich geringer war als bisher in der Literatur angenommen. Ein Grund dafür ist sicherlich, daß kultivierte synoviale Fibroblasten ihren Ursprung in verschiedenen Schichten des Gewebes haben und daher keine definierte Population von Zellen darstellen. Dies führt zu einer Überlagerung verschiedener Expressionsmuster, wodurch bestehende Unterschiede nivelliert werden können. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Kombination von Laser-mikrodissektion und RAP-PCR für unsere Proben etabliert. Dieses Verfahren ermöglicht es, gezielt Zellen aus verschiedenen Gewebebereichen wie lining und sublining zu gewinnen und deren Expressionsmuster miteinander zu vergleichen. Wie unter anderem die Identifizierung von Fibronectin in der synovialen Deckzellschicht zeigt, ist diese Methode zuverlässig und für die hier vorliegende Problemstellung geeignet.

Eine weitere Eigenheit synovialer RA-Fibroblasten sind die oft deutlichen interindividuellen Unterschiede in der Genexpression. Es ist somit notwendig, eine möglichst grosse Anzahl verschiedener Patientenproben auf die Expression möglichst vieler potentiell bedeutsamer Gene zu untersuchen, um diejenigen Sequenzen herauszufinden, die bei der Mehrheit der Patienten im Vergleich zu Kontrollen wie OA-Patienten, aber auch Gesunden oder Patienten mit anderen Arthritiden unterschiedlich exprimiert werden. Um eine hierfür besser geeignete Methode zu etablieren, wurde mit der Entwicklung der RAP-PCR-Mikroarrays begonnen, die diese Untersuchungen auf eine ökonomischere Art und Weise als die heute verwendeten Verfahren ermöglichen werden.

Für die mit Hilfe der RAP-PCR als differentiell exprimiert identifizierten Gene CENP-E (Zentromerprotein E) und SDF1 (stromal cell derived factor 1) bestehen Hinweise, die deren vermehrte Expression als relevant für die Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis erscheinen lassen. CENP-E könnte analog zu seiner Funktion bei der Sklerodermie als Autoantigen wirken, seine Überexpression kann aber auch in Zusammenhang stehen mit vermehrtem Wachstum einzelner Fibroblasten-Subpopulationen z.B. an der Invasionszone.

Die Bedeutung von SDF1 für die Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis ist auch aufgrund der grossen interindividuellen Expressionsunterschiede und der Vielzahl der Funktionen dieses Chemokins nicht leicht zu erschliessen. Da SDF1 jedoch nicht nur chemotaktisch auf verschiedenste Zellen des Immunsystems wirkt, sondern auch synoviale Fibroblasten den SDF1-Rezeptor CXCR4 exprimieren und deutliches chemotaktisches Verhalten zeigen, ist eine Relevanz, eventuell sogar in Bezug auf die Interaktion mehrerer Zelltypen, sehr wahrscheinlich. Die Herunterregulierung sowohl des Chemokins als auch seines Rezeptors durch Steroide kann deren antiinflammatorische Wirkung mit erklären. Das komplexe, je nach Konzentration unterschiedliche Zusammenspiel verschiedener Zytokine bei entzündlichen Erkrankungen ist jedoch bisher erst bruchstückhaft aufgeklärt, hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Untersuchungen des p53-Gens, die aufgrund der vermuteten Apoptoseresistenz der synovialen RA-Fibroblasten begonnen wurden, ergaben, daß Mutationen dieses wichtigen Tumorsuppressorgens im Genom dieser Zellen höchstens vereinzelt vorkommen, somit also wohl keine substantielle Rolle bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis spielen.

Zusammenfassend wurde mit der vorliegenden Arbeit erstmals eine zuverlässige Strategie etabliert, mit der bei multifaktoriellen nichtmalignen Erkrankungen wie der RA auch feine Unterschiede in der Genexpression identifiziert werden können.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aicher,W.K., Heer,A.H., Trabandt,A., Bridges,S.L., Schroeder,H.W., Stransky,G., Gay,R.E., Eibel,H., Peter,H.H., Siebenlist,U., & . (1994) Overexpression of zinc-finger transcription factor Z-225/Egr-1 in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *J.Immunol.*, **152**, 5940-5948.
2. Aicher,W.K., Peter,H.H., & Eibel,H. (1996) Human synovial fibroblasts are resistant to Fas induced apoptosis. (Abstract).*Arthritis Rheum*, **39**, 75.
3. Aiuti,A., Webb,I.J., Bleul,C., Springer,T., & Gutierrez-Ramos,J.C. (1997) The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J.Exp.Med.*, **185**, 111-120.
4. Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., & Lipman,D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
5. Angel,P. & Karin,M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim.Biophys.Acta*, **1072**, 129-157.
6. Arnett,F.C., Edworthy,S.M., Bloch,D.A., McShane,D.J., Fries,J.F., Cooper,N.S., Healey,L.A., Kaplan,S.R., Liang,M.H., & Luthra,H.S. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **31**, 315-324.
7. Asada,M., Yamada,T., Ichijo,H., Delia,D., Miyazono,K., Fukumuro,K., & Mizutani,S. (1999) Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J.*, **18**, 1223-1234.
8. Asahara,H., Hasumuna,T., Kobata,T., Yagita,H., Okumura,K., Inoue,H., Gay,S., Sumida,T., & Nishioka,K. (1996) Expression of Fas antigen and Fas ligand in the rheumatoid synovial tissue. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, **81**, 27-34.
9. Aupperle,K.R., Boyle,D.L., Hendrix,M., Seftor,E.A., Zvaifler,N.J., Barbosa,M., & Firestein,G.S. (1998) Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *Am.J.Pathol.*, **152**, 1091-1098.

10. Baggiolini,M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, **392**, 565-568.
11. Baggiolini,M., Dewald,B., & Moser,B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu.Rev.Immunol.*, **15**, 675-705.
12. Baird,A.M., Gerstein,R.M., & Berg,L.J. (1999) The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr.Opin.Immunol.*, **11**, 157-166.
13. Bajetto,A., Barbero,S., Bonavia,R., Piccioli,P., Pirani,P., Florio,T., & Schettini,G. (2001) Stromal cell-derived factor-1alpha induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J.Neurochem.*, **77**, 1226-1236.
14. Battaglia,C., Salani,G., Consolandi,C., Bernardi,L.R., & De Bellis,G. (2000) Analysis of DNA microarrays by non-destructive fluorescent staining using SYBR green II. *Bio-techniques*, **29**, 78-81.
15. Begum,N.A., Coker,A., Shibuta,K., Swanson,R.S., Chen,L.B., Mori,M., & Barnard,G.F. (1996) Loss of hIRH mRNA expression from premalignant adenomas and malignant cell lines. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **229**, 864-868.
16. Berndt,A., Borsi,L., Luo,X., Zardi,L., Katenkamp,D., & Kosmehl,H. (1998) Evidence of ED-B+ fibronectin synthesis in human tissues by non- radioactive RNA in situ hybridization. Investigations on carcinoma (oral squamous cell and breast carcinoma), chronic inflammation (rheumatoid synovitis) and fibromatosis (Morbus Dupuytren). *Histochem.Cell Biol.*, **109**, 249-255.
17. Beroud,C. & Soussi,T. (1998) p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 200-204.
18. Bleul,C.C., Farzan,M., Choe,H., Parolin,C., Clark-Lewis,I., Sodroski,J., & Springer,T.A. (1996b) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, **382**, 829-833.
19. Bleul,C.C., Fuhlbrigge,R.C., Casasnovas,J.M., Aiuti,A., & Springer,T.A. (1996a) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J.Exp.Med.*, **184**, 1101-1109.



20. Bleul,C.C., Schultze,J.L., & Springer,T.A. (1998) B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J.Exp.Med.*, **187**, 753-762.
21. Bohm,M., Wieland,I., Schutze,K., & Rubben,H. (1997) Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. *Am.J.Pathol.*, **151**, 63-67.
22. Bosari,S., Marchetti,A., Buttitta,F., Graziani,D., Borsani,G., Loda,M., Bevilacqua,G., & Coggi,G. (1995) Detection of p53 mutations by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) gel electrophoresis. A comparative study of radioactive and non-radioactive silver-stained SSCP analysis. *Diagn.Mol.Pathol.*, **4**, 249-255.
23. Brouty-Boye,D., Pottin-Clemenceau,C., Doucet,C., Jasmin,C., & Azzarone,B. (2000) Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur.J.Immunol.*, **30**, 914-919.
24. Brown,K.D., Coulson,R.M., Yen,T.J., & Cleveland,D.W. (1994) Cyclin-like accumulation and loss of the putative kinetochore motor CENP-E results from coupling continuous synthesis with specific degradation at the end of mitosis. *J.Cell Biol.*, **125**, 1303-1312.
25. Burmester,G.R., Daser,A., Kamradt,T., Krause,A., Mitchison,N.A., Sieper,J., & Wolf,N. (1995) Immunology of reactive arthritides. *Annu.Rev.Immunol.*, **13**, 229-250.
26. Chan-Palay,V., Yasargil,G., Hamid,Q., Polak,J.M., & Palay,S.L. (1988) Simultaneous demonstrations of neuropeptide Y gene expression and peptide storage in single neurons of the human brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **85**, 3213-3215.
27. Clark,P.A., Lester,T., Genet,S., Jones,A.M., Hendriks,R., Levinsky,R.J., & Kinnon,C. (1995) Screening for mutations causing X-linked severe combined immunodeficiency in the IL-2R gamma chain gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum.Genet.*, **96**, 427-432.
28. Clavel,C., Binniger,I., Bouterin,M.C., Polette,M., & Birembaut,P. (1991) Comparison of four non-radioactive and 35S-based methods for the detection of human papilloma-virus DNA by in situ hybridization. *J.Virol.Methods*, **33**, 253-266.

29. Cooke,C.A., Schaar,B., Yen,T.J., & Earnshaw,W.C. (1997) Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma*, **106**, 446-455.
30. Cox,A.D. (2001) Farnesyltransferase inhibitors: potential role in the treatment of cancer. *Drugs*, **61**, 723-732.
31. Davidson,A., Keiser,H.D., del Puente,A., Bennett,P.H., Schrohenloher,R., & Koopman,W.J. (1994) Expression of rheumatoid factor idiotypes 17.109, 6B6.6 and 4C9 in the sera of Pima Indians. *Autoimmunity*, **18**, 251-258.
32. Denijn,M., De Weger,R.A., Berends,M.J., Compier-Spies,P.I., Jansz,H., Van Unnik,J.A., & Lips,C.J. (1990) Detection of calcitonin-encoding mRNA by radioactive and non-radioactive in situ hybridization: improved colorimetric detection and cellular localization of mRNA in thyroid sections. *J.Histochem.Cytochem.*, **38**, 351-358.
33. Di Salvo,J., Koch,G.E., Johnson,K.E., Blake,A.D., Daugherty,B.L., DeMartino,J.A., Siro-tina-Meisher,A., Liu,Y., Springer,M.S., Cascieri,M.A., & Sullivan,K.A. (2000) The CXCR4 agonist ligand stromal derived factor-1 maintains high affinity for receptors in both Galpha(i)-coupled and uncoupled states. *Eur.J.Pharmacol.*, **409**, 143-154.
34. Dolcetti,R. & Boiocchi,M. (1996) Cellular and molecular bases of B-cell clonal expansions. *Clin.Exp.Rheumatol.*, **14 Suppl 14**, S3-13.
35. Dorries,U., Bartsch,U., Nolte,C., Roth,J., & Schachner,M. (1993) Adaptation of a non-radioactive in situ hybridization method to electron microscopy: detection of tenascin mRNAs in mouse cerebellum with digoxigenin-labelled probes and gold-labelled antibodies. *Histochemistry*, **99**, 251-262.
36. Fassbender,H.G. (1983) Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll.Relat Res.* , **3**, 141-155.
37. Firestein GS (1998) Rheumatoid synovitis and pannus. Rheumatology (ed. by Klippel JH & Dieppe PA), p. 5.13.1-5.13.24. Mosby, London.
38. Firestein,G.S. (1996) Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.*, **39**, 1781-1790.

39. Firestein,G.S., Echeverri,F., Yeo,M., Zvaifler,N.J., & Green,D.R. (1997) Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 10895-10900.
40. Firestein,G.S., Nguyen,K., Aupperle,K.R., Yeo,M., Boyle,D.L., & Zvaifler,N.J. (1996) Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am.J.Pathol.*, **149**, 2143-2151.
41. Franitza,S., HersHKoviz,R., Kam,N., Lichtenstein,N., Vaday,G.G., Alon,R., & Lider,O. (2000) TNF-alpha associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells. *J.Immunol.*, **165**, 2738-2747.
42. Franz JK, Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Burmester GR, & Gay S (1999) T-cell independent joint destruction. T cells in arthritis (ed. by Miossec P, van den Berg W, & Firestein GS), pp. 55-74. Birkenhäuser, Basel.
43. Franz,J.K., Pap,T., Hummel,K.M., Nawrath,M., Aicher,W.K., Shigeyama,Y., Müller-Ladner,U., Gay,R.E., & Gay,S. (2000) Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **43**, 599-607.
44. Furuta,Y., Shinohara,T., Sano,K., Meguro,M., & Nagashima,K. (1990) In situ hybridisation with digoxigenin-labelled DNA probes for detection of viral genomes. *J.Clin.Pathol.*, **43**, 806-809.
45. Gay,S., Gay,R.E., & Koopman,W.J. (1993) Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann.Rheum.Dis.*, **52 Suppl 1**, S39-S47.
46. Giaid,A., Hamid,Q., Adams,C., Springall,D.R., Terenghi,G., & Polak,J.M. (1989) Non-isotopic RNA probes. Comparison between different labels and detection systems. *Histochemistry*, **93**, 191-196.
47. Gonzalo,J.A., Lloyd,C.M., Peled,A., Delaney,T., Coyle,A.J., & Gutierrez-Ramos,J.C. (2000) Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J.Immunol.*, **165**, 499-508.

- 
48. Gregersen,P.K., Silver,J., & Winchester,R.J. (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **30**, 1205-1213.
49. Gulko,P.S., Seki,T., & Winchester,R. (2000) The role of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Rheumatoid Arthritis: New Frontiers in Pathogenesis and Treatment (ed. by Firestein GS, G. S. Panayi, & F. A. Wollheim), pp. 113-135. Oxford University Press, Oxford.
50. Gupta,S.K., Pillarisetti,K., Thomas,R.A., & Aiyar,N. (2001) Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1alpha: implications for development of selective CXCR4 antagonists. *Immunol.Lett.*, **78**, 29-34.
51. Hainaut,P., Hernandez,T., Robinson,A., Rodriguez-Tome,P., Flores,T., Hollstein,M., Harris,C.C., & Montesano,R. (1998) IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 205-213.
52. Hamada,T., Mohle,R., Hesselgesser,J., Hoxie,J., Nachman,R.L., Moore,M.A., & Rafii,S. (1998) Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J.Exp.Med.*, **188**, 539-548.
53. Han,Z., Boyle,D.L., Shi,Y., Green,D.R., & Firestein,G.S. (1999) Dominant-negative p53 mutations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **42**, 1088-1092.
54. Harris,C.C. & Hollstein,M. (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N.Engl.J.Med.*, **329**, 1318-1327.
55. Harris,E.D. (1997) Structure and composition of joints. Rheumatoid Arthritis (ed. by E. D. Harris), pp. 3-17. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
56. Hawkins,G.A. & Hoffman,L.M. (1997) Base excision sequence scanning. *Nat.Biotechnol.*, **15**, 803-804.
57. Hesselgesser,J. & Horuk,R. (1999) Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J.Neurovirol.*, **5**, 13-26.

- 
58. Hino,K., Shiozawa,S., Kuroki,Y., Ishikawa,H., Shiozawa,K., Sekiguchi,K., Hirano,H., Sakashita,E., Miyashita,K., & Chihara,K. (1995) EDA-containing fibronectin is synthesized from rheumatoid synovial fibroblast-like cells. *Arthritis Rheum*, **38**, 678-683.
59. Holland,P.M., Abramson,R.D., Watson,R., & Gelfand,D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **88**, 7276-7280.
60. Hollstein,M., Shomer,B., Greenblatt,M., Soussi,T., Hovig,E., Montesano,R., & Harris,C.C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 141-146.
61. Hoyhtya,M., Myllyla,R., Piuva,J., Kivirikko,K.I., & Tryggvason,K. (1984) Monoclonal antibodies to human prolyl 4-hydroxylase. *Eur.J.Biochem.*, **141**, 472-482.
62. Iwanaga,T., Shikichi,M., Kitamura,H., Yanase,H., & Nozawa-Inoue,K. (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch.Histol.Cytol.*, **63**, 17-31.
63. Jarvinen,P. & Aho,K. (1994) Twin studies in rheumatic diseases. *Semin.Arthritis Rheum.*, **24**, 19-28.
64. Judex,M., Neumann,E., Fleck,M., Pap,T., Mountz,J.D., Gay,R.E., Schölmerich,J., Nishio-ka,K., Gay,S., & Müller-Ladner,U. (2001) "Inverse wrap" – an improved implantation technique for virus-transduced synovial fibroblasts in the SCID-mouse model for rheumatoid arthritis. *Mod.Rheumatol.*, **11**, 145-150.
65. Kaipiainen-Seppanen,O., Aho,K., & Nikkarinen,M. (2001) Regional differences in the incidence of rheumatoid arthritis in Finland in 1995. *Ann.Rheum Dis.*, **60**, 128-132.
66. Kang,Y.K., Kim,C.J., Kim,W.H., Kim,H.O., Kang,G.H., & Kim,Y.I. (1998) p53 mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in the liver. *Virchows Arch.*, **432**, 27-32.
67. Katsuta,T., Lim,C., Shimoda,K., Shibuta,K., Mitra,P., Banner,B.F., Mori,M., & Barnard,G.F. (2000) Interleukin-8 and SDF1-alpha mRNA expression in colonic biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol.*, **95**, 3157-3164.

- 
68. Klimiuk,P.A., Sierakowski,S., Latosiewicz,R., Cylwik,B., Skowronski,J., & Chwiecko,J. (2001) Serum cytokines in different histological variants of rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.*, **28**, 1211-1217.
69. Komminoth,P. (1992) Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. *Diagn.Mol.Pathol.*, **1**, 142-150.
70. Koshiba,T., Hosotani,R., Miyamoto,Y., Ida,J., Tsuji,S., Nakajima,S., Kawaguchi,M., Kobayashi,H., Doi,R., Hori,T., Fujii,N., & Imamura,M. (2000) Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin.Cancer Res.*, **6**, 3530-3535.
71. Kovacs B, Patel A, Dennis G, & Tsokos GC (1996) Anti-p53 antibodies in the sera of patients with SLE are not associated im mutations in the p53 gene. (Abstract).*Arthritis Rheum*, **39 Suppl. 9**, 41-41.
72. Lafyatis,R., Remmers,E.F., Roberts,A.B., Yocum,D.E., Sporn,M.B., & Wilder,R.L. (1989) Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J.Clin.Invest*, **83**, 1267-1276.
73. Lalor,P.A., Mapp,P.I., Hall,P.A., & Revell,P.A. (1987) Proliferative activity of cells in the synovium as demonstrated by a monoclonal antibody, Ki67. *Rheumatol.Int.*, **7**, 183-186.
74. Lavarino,C., Corletto,V., Mezzelani,A., Della,T.G., Bartoli,C., Riva,C., Pierotti,M.A., Rilke,F., & Pilotti,S. (1998) Detection of TP53 mutation, loss of heterozygosity and DNA content in fine-needle aspirates of breast carcinoma. *Br.J.Cancer*, **77**, 125-130.
75. Lechner,S., Müller-Ladner,U., Neumann,E., Dietmaier,W., Welsh,J., Scholmerich,J., Ruschoff,J., & Kullmann,F. (2001) Use of simplified transcripts for the analysis of gene expression profiles in laser-microdissected cell populations. *Lab Invest*, **81**, 1233-1242.
76. Liang,P., Averboukh,L., Keyomarsi,K., Sager,R., & Pardee,A.B. (1992) Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, **52**, 6966-6968.

- 
77. Liang,P. & Pardee,A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971.
78. Liang,P., Zhu,W., Zhang,X., Guo,Z., O'Connell,R.P., Averboukh,L., Wang,F., & Pardee,A.B. (1994) Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5763-5764.
79. Lombillo,V.A., Nislow,C., Yen,T.J., Gelfand,V.I., & McIntosh,J.R. (1995) Antibodies to the kinesin motor domain and CENP-E inhibit microtubule depolymerization-dependent motion of chromosomes in vitro [see comments]. *J.Cell Biol.*, **128**, 107-115.
80. Lu,X. & Lane,D.P. (1993) Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell*, **75**, 765-778.
81. Ma,Q., Jones,D., Borghesani,P.R., Segal,R.A., Nagasawa,T., Kishimoto,T., Bronson,R.T., & Springer,T.A. (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95**, 9448-9453.
82. MacGregor,A., Ollier,W., Thomson,W., Jawaheer,D., & Silman,A. (1995) HLA-DRB1\*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J.Rheumatol.*, **22**, 1032-1036.
83. Maini,R.N. & Taylor,P.C. (2000) Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu.Rev.Med.*, **51**, 207-229.
84. Mancuso,T., Aguilar,F., Pescarolo,M.P., Clerico,L., Russo,P., & Parodi,S. (1997) Mutation frequencies at codon 248 of the p53 tumour suppressor gene are not increased in colon cancer cell lines with the RER+ phenotype. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3643-3648.
85. Mangasser-Stephan,K., Dooley,S., Welter,C., Mutschler,W., & Hanselmann,R.G. (1997) Identification of human semaphorin E gene expression in rheumatoid synovial cells by mRNA differential display. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **234**, 153-156.
86. Martel-Pelletier,J., Alaaeddine,N., & Pelletier,J.P. (1999) Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci.*, **4**, D694-D703.

- 
87. Mathieu-Daude,F., Cheng,R., Welsh,J., & McClelland,M. (1996b) Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1504-1507.
88. Mathieu-Daude,F., Welsh,J., Vogt,T., & McClelland,M. (1996a) DNA rehybridization during PCR: the 'Cot effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2080-2086.
89. Matsumoto,S., Müller-Ladner,U., Gay,R.E., Nishioka,K., & Gay,S. (1996) Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J.Rheumatol.*, **23**, 1345-1352.
90. McClelland,M., Mathieu-Daude,F., & Welsh,J. (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet.*, **11**, 242-246.
91. Megonigal,M.D., Rappaport,E.F., Jones,D.H., Kim,C.S., Nowell,P.C., Lange,B.J., & Felix,C.A. (1997) Panhandle PCR strategy to amplify MLL genomic breakpoints in treatment- related leukemias. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 11583-11588.
92. Miller,F.R., Barnabas,N., Liu,X., Wang,B., & Park,J. (1999) Differential display, subtractive hybridization, and application of methodology to search for point mutations to identify genetic defects responsible for progression in MCF10AT model of human breast disease. *Electrophoresis*, **20**, 256-260.
93. Mirshahi,F., Pourtau,J., Li,H., Muraine,M., Trochon,V., Legrand,E., Vannier,J., Soria,J., Vasse,M., & Soria,C. (2000) SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. *Thromb.Res.*, **99**, 587-594.
94. Mitsui,K., Matsumoto,A., Ohtsuka,S., Ohtsubo,M., & Yoshimura,A. (1999) Cloning and characterization of a novel p21(Cip1/Waf1)-interacting zinc finger protein, ciz1. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **264**, 457-464.
95. Mohle,R., Bautz,F., Rafii,S., Moore,M.A., Brugger,W., & Kanz,L. (1998) The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, **91** , 4523-4530.



- 
96. Moles,J.P., Theillet,C., Basset-Seguin,N., & Guilhou,J.J. (1993) Mutation of the tumor suppressor gene TP53 is not detected in psoriatic skin. *J.Invest Dermatol.*, **101**, 100-102.
97. Mountz,J.D., Wu,J., Cheng,J., & Zhou,T. (1994) Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum*, **37**, 1415-1420.
98. Müller-Ladner,U., Kriegsmann,J., Franklin,B.N., Matsumoto,S., Geiler,T., Gay,R.E., & Gay,S. (1996) Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am.J.Pathol.*, **149**, 1607-1615.
99. Müller-Ladner,U., Kriegsmann,J., Gay,R.E., & Gay,S. (1995) Oncogenes in rheumatoid arthritis. *Rheum.Dis.Clin.North Am.*, **21**, 675-690.
100. Muller,A., Homey,B., Soto,H., Ge,N., Catron,D., Buchanan,M.E., McClanahan,T., Murphy,E., Yuan,W., Wagner,S.N., Barrera,J.L., Mohar,A., Verastegui,E., & Zlotnik,A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, **410**, 50-56.
101. Müller-Ladner,U., Gay,R.E., & Gay,S. (1996) Cysteine proteases in arthritis and inflammation. Perspectives in drug discovery and design (ed. by James MNG & McKerrrow JH), pp. 87-98. ESCOM Science Publishers, Leiden.
102. Nagasawa,T., Kikutani,H., & Kishimoto,T. (1994) Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 2305-2309.
103. Nakajima,T., Aono,H., Hasunuma,T., Yamamoto,K., Shirai,T., Hirohata,K., & Nishio-ka,K. (1995) Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synovocytes. *Arthritis Rheum.*, **38**, 485-491.
104. Nanki,T., Hayashida,K., El Gabalawy,H.S., Suson,S., Shi,K., Girschick,H.J., Yavuz,S., & Lipsky,P.E. (2000) Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J.Immunol.*, **165**, 6590-6598.

105. Nikkari,L., Haapasalmi,K., Aho,H., Torvinen,A., Sheppard,D., Larjava,H., & Heino,J. (1995) Localization of the alpha v subfamily of integrins and their putative ligands in synovial lining cell layer. *J.Rheumatol.*, **22**, 16-23.
106. Nishioka,K., Sumida,T., & Hasunuma,T. (1996) Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum.*, **39**, 1410-1418.
107. Nonomura,Y., Kohsaka,H., Nasu,K., Terada,Y., Ikeda,M., & Miyasaka,N. (2001) Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Cip1) gene into the joints. *Int.Immunol.*, **13**, 723-731.
108. Okura,T., Gong,L., Kamitani,T., Wada,T., Okura,I., Wei,C.F., Chang,H.M., & Yeh,E.T. (1996) Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J.Immunol.*, **157**, 4277-4281.
109. Orita,M., Iwahana,H., Kanazawa,H., Hayashi,K., & Sekiya,T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **86**, 2766-2770.
110. Pap T, Franz JK, Gay RE, & Gay S (1999) Has research on lymphocytes hindered progress in Rheumatoid Arthritis? Challenges in rheumatoid arthritis (ed. by Bird H & Snaith M).
111. Pelletier,A.J., van der Laan,L.J., Hildbrand,P., Siani,M.A., Thompson,D.A., Dawson,P.E., Torbett,B.E., & Salomon,D.R. (2000) Presentation of chemokine SDF-1 alpha by fibronectin mediates directed migration of T cells. *Blood*, **96**, 2682-2690.
112. Pettit,A.R. & Thomas,R. (1999) Dendritic cells: the driving force behind autoimmunity in rheumatoid arthritis? *Immunol.Cell Biol.*, **77**, 420-427.
113. Pincus,T. (1995) The underestimated long term medical and economic consequences of rheumatoid arthritis. *Drugs*, **50 Suppl 1**, 1-14.
114. Poznansky,M.C., Olszak,I.T., Foxall,R., Evans,R.H., Luster,A.D., & Scadden,D.T. (2000) Active movement of T cells away from a chemokine. *Nat.Med.*, **6**, 543-548.
115. Puck,J.M., Pepper,A.E., Henthorn,P.S., Candotti,F., Isakov,J., Whitwam,T., Conley,M.E., Fischer,R.E., Rosenblatt,H.M., Small,T.N., & Buckley,R.H. (1997) Mutati-

- on analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood*, **89**, 1968-1977.
116. Qu,Z., Huang,X.N., Ahmadi,P., Andresevic,J., Planck,S.R., Hart,C.E., & Rosenbaum,J.T. (1995) Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Lab Invest*, **73**, 339-346.
117. Rattner,J.B., Rees,J., Arnett,F.C., Reveille,J.D., Goldstein,R., & Fritzler,M.J. (1996) The centromere kinesin-like protein, CENP-E. An autoantigen in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.*, **39**, 1355-1361.
118. Reme,T., Travaglio,A., Gueydon,E., Adla,L., Jorgensen,C., & Sany,J. (1998) Mutations of the p53 tumour suppressor gene in erosive rheumatoid synovial tissue. *Clin.Exp.Immunol.*, **111**, 353-358.
119. Rothschild,B.M., Woods,R.J., Rothschild,C., & Sebes,J.I. (1992) Geographic distribution of rheumatoid arthritis in ancient North America: implications for pathogenesis [see comments]. *Semin.Arthritis Rheum.*, **22**, 181-187.
120. Salcedo,R., Wasserman,K., Young,H.A., Grimm,M.C., Howard,O.M., Anver,M.R., Kleinman,H.K., Murphy,W.J., & Oppenheim,J.J. (1999) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am.J.Pathol.*, **154**, 1125-1135.
121. Sallusto,F., Lanzavecchia,A., & Mackay,C.R. (1998) Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2- mediated responses. *Immunol.Today*, **19**, 568-574.
122. Seki,T., Selby,J., Haupl,T., & Winchester,R. (1998) Use of differential subtraction method to identify genes that characterize the phenotype of cultured rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum*, **41**, 1356-1364.
123. Sevignani,C., Wlodarski,P., Kirillova,J., Mercer,W.E., Danielson,K.G., Iozzo,R.V., & Calabretta,B. (1998) Tumorigenic conversion of p53-deficient colon epithelial cells by an activated Ki-ras gene. *J.Clin.Invest*, **101**, 1572-1580.

- 
124. Sheffield,V.C., Beck,J.S., Kwitek,A.E., Sandstrom,D.W., & Stone,E.M. (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, **16**, 325-332.
125. Shi,X.B., Bodner,S.M., deVere White,R.W., & Gumerlock,P.H. (1996) Identification of p53 mutations in archival prostate tumors. Sensitivity of an optimized single-strand conformational polymorphism (SSCP) assay. *Diagn.Mol.Pathol.*, **5**, 271-278.
126. Shinoura,N., Shamraj,O.I., Hugenholtz,H., Zhu,J.G., McBlack,P., Warnick,R., Tew,J.J., Wani,M.A., & Menon,A.G. (1995) Identification and partial sequence of a cDNA that is differentially expressed in human brain tumors. *Cancer Lett.*, **89**, 215-221.
127. Shirozu,M., Nakano,T., Inazawa,J., Tashiro,K., Tada,H., Shinohara,T., & Honjo,T. (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell- derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, **28**, 495-500.
128. Spitz,F.R., Nguyen,D., Skibber,J.M., Cusack,J., Roth,J.A., & Cristiano,R.J. (1996) In vivo adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for colorectal cancer. *Anticancer Res.*, **16**, 3415-3422.
129. Stockwell.R.A. & Meachim,G. (1979) The Chondrocytes. Adult Articular Cartilage (ed. by M. A. R. Freeman), pp. 69-145. Pitman Medical, London.
130. Storm,E.E. & Kingsley,D.M. (1996) Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development*, **122**, 3969-3979.
131. Stransky,G., Vernon,J., Aicher,W.K., Moreland,L.W., Gay,R.E., & Gay,S. (1993) Virus-like particles in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Br.J.Rheumatol.*, **32** , 1044-1048.
132. Sun,Y., Sun,Y.I., Wenger,L., & Brinckerhoff,C.E. (1998) p53 downregulates human metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene expression. (Abstract).*Arthritis Rheum*, **41 Suppl. 9**, 275.
133. Suzuki,Y., Rahman,M., & Mitsuya,H. (2001) Diverse Transcriptional Response of CD4(+) T Cells to Stromal Cell- Derived Factor (SDF)-1: Cell Survival Promotion and Priming Effects of SDF-1 on CD4(+) T Cells. *J.Immunol.*, **167**, 3064-3073.

- 
134. Tanabe,S., Heesen,M., Yoshizawa,I., Berman,M.A., Luo,Y., Bleul,C.C., Springer,T.A., Okuda,K., Gerard,N., & Dorf,M.E. (1997) Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J.Immunol.*, **159**, 905-911.
135. Tashiro,K., Tada,H., Heilker,R., Shirozu,M., Nakano,T., & Honjo,T. (1993) Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, **261**, 600-603.
136. Thrower,D.A., Jordan,M.A., Schaar,B.T., Yen,T.J., & Wilson,L. (1995) Mitotic HeLa cells contain a CENP-E-associated minus end-directed microtubule motor. *EMBO J.*, **14**, 918-926.
137. Thrower,D.A., Jordan,M.A., & Wilson,L. (1996) Modulation of CENP-E organization at kinetochores by spindle microtubule attachment. *Cell Motil.Cytoskeleton*, **35**, 121-133.
138. Tortola,S., Capella,G., Marcuello,E., Gunther,K., Aiza,G., Masramon,L., Raymond,M.A., & Peinado,M.A. (1998) Analysis of differential gene expression in human colorectal tumor tissues by RNA arbitrarily primed-PCR: a technical assessment. *Lab Invest*, **78**, 309-317.
139. Trabant,A., Aicher,W.K., Gay,R.E., Sukhatme,V.P., Fassbender,H.G., & Gay,S. (1992) Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol.Int.*, **12**, 53-59.
140. Trabant,A., Aicher,W.K., Gay,R.E., Sukhatme,V.P., Nilson-Hamilton,M., Hamilton,R.T., McGhee,J.R., Fassbender,H.G., & Gay,S. (1990) Expression of the collagenolytic and Ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/I mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix*, **10**, 349-361.
141. Trabant,A., Gay,R.E., Fassbender,H.G., & Gay,S. (1991) Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **34**, 1444-1451.
142. Ulfgren,A.K., Lindblad,S., Klareskog,L., Andersson,J., & Andersson,U. (1995) Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.*, **54**, 654-661.

- 
143. Van der Lubbe,P.A., Dijkmans,A.C., Markusse,H.M., Nässander,U., & Breedveld,F.C. (1994) Lack of clinical effect of monoclonal CD4 antibody therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **37**, 294.
144. van Rensburg,E.J., Engelbrecht,S., van Heerden,W.F., Kotze,M.J., & Raubenheimer,E.J. (1998) Detection of p53 gene mutations in oral squamous cell carcinomas of a black African population sample. *Hum.Mutat.*, **11**, 39-44.
145. Vogelstein,B. & Kinzler,K.W. (1992) p53 function and dysfunction. *Cell*, **70**, 523-526.
146. von Muhlen,C.A. & Tan,E.M. (1995) Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin.Arthritis Rheum*, **24**, 323-358.
147. Waller,H.A., Butler,M.G., McClean,J.G., Dowd,G.S., & Scott,D.L. (1992) Localisation of fibronectin mRNA in the rheumatoid synovium by in situ hybridisation. *Ann.Rheum Dis.*, **51**, 735-740.
148. Wang,Y.C., Chen,C.Y., Chen,S.K., Cherng,S.H., Ho,W.L., & Lee,H. (1998) High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res.*, **58**, 328-333.
149. Welsh,J., Chada,K., Dalal,S.S., Cheng,R., Ralph,D., & McClelland,M. (1992) Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4965-4970.
150. Welsh,J. & McClelland,M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7213-7218.
151. Welsh,J., Petersen,C., & McClelland,M. (1991) Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 303-306.
152. Wildsmith,S.E. & Elcock,F.J. (2001) Microarrays under the microscope. *Mol.Pathol.*, **54**, 8-16.
153. Yagi,O.K., Akiyama,Y., Nomizu,T., Iwama,T., Endo,M., & Yuasa,Y. (1998) Proapoptotic gene BAX is frequently mutated in hereditary nonpolyposis colorectal cancers but not in adenomas. *Gastroenterology*, **114**, 268-274.

154. Yeatman,T.J. & Mao,W. (1995) Identification of a differentially-expressed message associated with colon cancer liver metastasis using an improved method of differential display. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4007-4008.
155. Yelin,E. (1996) The costs of rheumatoid arthritis: absolute, incremental, and marginal estimates. *J.Rheumatol.Suppl*, **44**, 47-51.
156. Yen,T.J., Compton,D.A., Wise,D., Zinkowski,R.P., Brinkley,B.R., Earnshaw,W.C., & Cleveland,D.W. (1991) CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO J.*, **10**, 1245-1254.
157. Yen,T.J., Li,G., Schaar,B.T., Szilak,I., & Cleveland,D.W. (1992) CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis [see comments]. *Nature*, **359**, 536-539.

## 8 Anhang

### Publikationen:

1. Müller-Ladner U, Judex M, Jüsten H-P, Wessinghage D, Welsh J, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Kullmann F. Analyse des Genexpressionsmusters in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis mittels RNA-Fingerprint. *Med Klin* 94, 228-232, 1999.
2. Kullmann F, Judex M, Neudecker I, Lechner S, Jüsten H-P, Green DR, Wessinghage D, Firestein GS, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Analysis of the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 42, 1594-1600, 1999.
3. Kullmann F, Judex M, Ballhorn W, Jüsten H-P, Wessinghage D, Yen T, Welsh J, Lang B, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Kinesin-like protein CENP-E is upregulated in rheumatoid synovial fibroblasts, *Arthritis Res* 1, 71-80, 1999.
4. Müller-Ladner U, Judex M, Schlottmann K, Gay RE, Ballhorn W, Kullmann F, Schölmerich J, Gay S. Activation of the IL-4 STAT pathway in rheumatoid synovium. *J Immunol* 164, 3894-3901, 2000.
5. Kullmann F, Judex M, Neudecker I, Lechner S, Jüsten H-P, Green DR, Wessinghage D, Firestein GS, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Analysis of the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rev Series Rheumatol* 1, 18-20, 2001.
6. Judex M, Neumann E, Fleck M, Pap T, Mountz JD, Gay RE, Schölmerich J, Nishioka K, Gay S, Müller-Ladner U. "Inverse wrap" – an improved implantation technique for virus-transduced synovial fibroblasts in the SCID-mouse model for RA. *Mod Rheumatol* 11, 145-150, 2001.



7. Neumann E, Kullmann F, Judex M, Jüsten HP, Wessinghage D, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Identification of differentially expressed genes in rheumatoid arthritis by a combination of cDNA array and RAP-PCR. *Arthritis Rheum*, im Druck.
8. Alexander D, Judex M, Meyringer R, Weis-Klemm M, Müller-Ladner U, Aicher WK. Transcription Factor Egr-1 Promotes Synovial Fibrosis by Activation of Type I Collagen and Reduction of Gelatinase (MMP-2) Expression. *Arthritis Rheum*, eingereicht.

### **Posterbeiträge und Vorträge:**

1. Kullmann F, Judex M, Ballhorn W, Jüsten H-P, Wessinghage D, Welsh J, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Lang B, Müller-Ladner U. Spezifische Expression von Kinesin-like Protein CENP-E in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA). *Z Rheumatol* 57, Suppl. 1, 33, 1998.
2. Judex M, Kullmann F, Jüsten H-P, Ballhorn W, Welsh J, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Lang B, Wessinghage D, Müller-Ladner U. Analyse von differentiell exprimierten Genen in Fibroblasten verschiedener Gelenke eines Patienten mit rheumatoider Arthritis mittels RNA Fingerprint. *Z Rheumatol* 57, Suppl. 1, 51, 1998.
3. Kullmann F, Judex M, Ballhorn W, Jüsten HP, Wessinghage D, Welsh J, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Lang B, Müller-Ladner U. Kinesin-like protein CENP-E is specifically upregulated in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 41, S95, 1998.
4. Judex M, Kullmann F, Jüsten HP, Ballhorn W, Welsh J, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Lang B, Wessinghage D, Müller-Ladner U. RNA fingerprint-based detection of differentially regulated genes in different joints of a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41, S95, 1998.
5. Judex M, Kullmann F, Ballhorn W, Jüsten HP, Wessinghage D, Welsh J, Lang B, Gay S, McClelland M, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Demonstration of specific upregulation of kinesin-like protein CENP-E in rheumatoid synovial fibroblasts using RNA fingerprinting (RAP-PCR). *Immunobiol* 199, 658-659, 1998 (Vortrag und Poster).

6. Müller-Ladner U, Judex M, Jüsten H-P, Ballhorn W, Welsh J, McClelland M, Gay S, Lang B, Wessinghage D, Schölmerich J, Kullmann F. Analyse von differentiell exprimierten Genen in synovialen Fibroblasten mittels RNA Fingerprint. Vortrag. XXVI. Tagung des Arbeitskreises Klinische Immunologie, Frankfurt/Hoechst, Oktober 1998.
7. Kullmann F, Judex M, Jüsten H-P, Ballhorn W, Welsh J, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Lang B, Wessinghage D, Müller-Ladner U. Analyse des Genexpressionsmusters in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis mittels RNA Fingerprint, Vortrag. 104. Kongreß der DGIM, Wiesbaden, April 1999.
8. Judex M, Kullmann F, Neumann E, Jüsten H-P, Wessinghage D, Welsh J, Nishioka K, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Virus-dependent proto-oncogene-mediated chemotaxis - a novel pathway operative in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 42, S247, 1999.
9. Kullmann F, Judex M, Jüsten H-P, Wessinghage D, Welsh J, Yen TJ, Hittle JC, McClelland M, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Regulation of kinesin-like protein CENP-E in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 42, S86, 1999.
10. Judex M, Lechner S, Neumann E, Jüsten H-P, Wessinghage D, Gay S, Firestein GS, Schölmerich J, Kullmann F, Müller-Ladner U. Analyse des p53 Tumor Suppressor Gens in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. *Z Rheumatol* 58, Suppl. 1, 40, 1999.
11. Judex M, Kullmann F, Lechner S, Neumann E, Jüsten H-P, Gay S, Wessinghage D, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Expression und Regulation von CENP-E in Synovium und synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. *Z Rheumatol* 58, Suppl. 1, 42, 1999.
12. Müller-Ladner U, Judex M, Neumann E, Fleck M, Kullmann F, Gay RE, Mountz JD, Nishioka K, McClelland M, Schölmerich J, Gay S. Gene expression analysis reveals novel molecular mechanisms in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ryumachi* 40, 318, 2000.

13. Fleck M, Neumann E, Kullmann F, Judex M, Jüsten HP, Mountz JD, Wessinghage D, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Proto-Onkogen-Expression in rheumatoiden Fibroblasten nach adenoviralem TNF- $\alpha$ Rp55 Gentransfer. Med Klin 95 (Abstract-Band I), 110, 2000.
14. Neumann E, Fleck M, Judex M, Kullmann F, Jüsten HP, Mountz JD, Wessinghage D, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Alteration of proto-oncogene pattern in rheumatoid synovial fibroblasts following adenovirus-based TNFR p55 gene transfer. Ann Rheum Dis 59 (Supplement 1), 38, 2000.
15. Meyringer R, Judex M, Distler O, Szeimies R, Landthaler M, Kullmann F, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Analysis of gene expression patterns in scleroderma fibroblasts using RAP-PCR for differential display. Ann Rheum Dis 59 (Supplement 1), 50, 2000.
16. Judex M, Neumann E, Fleck M, Pap T, Mountz JD, Gay RE, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U. Improved implantation technique for virus-based gene transfer in the SCID-mouse model for RA. Ann Rheum Dis 59 (Supplement 1), 145, 2000.
17. Judex M, Neumann E, Kullmann F, Wessinghage D, Jüsten HP, Schölmerich J, Gay S, Welsh J, McClelland M, Müller-Ladner U. Identifizierung differentiell exprimierter Gene bei der rheumatoiden Arthritis mittels einer Kombination aus RAP-PCR und cDNA array. Z Rheumatol 59 (Suppl. 3), III/31, 2000.
18. Meyringer R, Distler O, Judex M, Szeimies R, Landthaler M, Kullmann F, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Analyse differentieller Genexpression in Hautfibroblasten von Patienten mit Sklerodermie mittels RAP-PCR für Differential Display. Z Rheumatol 59 (Suppl. 3), III/31, 2000.
19. Judex M, Neumann E, Fleck M, Pap T, Mountz JD, Gay RE, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U. Neue Implantationstechnik für virustransduzierte Zellen im SCID-Maus Modell der rheumatoiden Arthritis (RA). Z Rheumatol 59 (Suppl. 3), III/38, 2000.
20. Neumann E, Fleck M, Kullmann F, Judex M, Jüsten HP, Mountz JD, Wessinghage D, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Auswirkung des adenoviralen TNF- $\alpha$ Rp55 Gen-

- transfers auf die Proto-Onkogen-Expression in rheumatoiden Synovialfibroblasten. *Z Rheumatol* 59 (Suppl. 3), III/54, 2000.
21. Neumann E, Judex M, Kullmann F, Jüsten HP, Robbins PD, Evans CH, Wessinghage D, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Viraler IL-10 oder IL-1ra Gentransfer in rheumatoide Synovialfibroblasten: Auswirkungen auf Genexpression und Aggressivität gegenüber Gelenkknorpel. *Z Rheumatol* 59 (Suppl. 3), III/55, 2000.
22. Meyringer R, Judex M, Distler O, Szeimies RM, Landthaler M, Kullmann F, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Analysis of gene expression patterns in systemic sclerosis (SSc) fibroblasts using RAP-PCR for differential display. Poster. International Symposium on Systemic Sclerosis. Vaalsbroek, NL, September 2000, Book of Abstracts.
23. Judex M, Neumann E, Kullmann F, Wessinghage D, Jüsten H-P, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U. Identification of differentially expressed genes in rheumatoid synovial fibroblasts using a highly sensitive combination of RAP-PCR and cDNA expression array. *Arthritis Rheum* 43, S54, 2000.
24. Neumann E, Judex M, Pap T, Kullmann F, Robbins PD, Gay RE, Evans C, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Retroviral IL-10 and IL-1Ra gene transfer in rheumatoid synovial fibroblasts alters proto-oncogene and intracellular signaling gene expression. *Arthritis Rheum* 43, S56, 2000.
25. Judex M, Neumann E, Kullmann F, Wessinghage D, Jüsten H-P, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U. Combination of RAP-PCR and for differential display and cDNA expression array identifies p33ING1 and CD82, genes hitherto unrelated to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, S96, 2000.
26. Neumann E, Fleck M, Judex M, Jüsten H-P, Mountz JD, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Alteration of proto-oncogene and cytokine expression following adenovirus-based TNF $\alpha$ R p55 gene transfer in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 43, S100, 2000.

27. Meyringer R, Judex M, Distler O, Szeimies R-M, Landthaler M, Kullmann F, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Analysis of gene expression patterns in systemic sclerosis (SSc) fibroblasts using RAP-PCR for differential display. *Arthritis Rheum* 43, S168, 2000.
28. Neumann E, Judex M, Pap T, Distler O, Gay RE, Robbins PD, Evans CH, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U. Additive cartilage protection by retrovirus-based double gene transfer with IL-10 and IL-1Ra in the SCID mouse model for RA. *Arthritis Rheum* 43, S170, 2000.
29. Neumann E, Judex M, Kullmann F, Pap T, Robbins PD, Evans CH, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Anti-cytokine double gene transfer in the SCID mouse model. *Immunobiol* 203, 483, 2000.
30. Neumann E, Judex M, Kullmann F, Schölmerich J, Distler O, Gay S, Müller-Ladner U. A highly sensitive method to identify differentially expressed genes in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunobiol* 203, 483-484, 2000.
31. Müller-Ladner U, Neumann E, Judex M, Distler O, Gay RE, Kullmann F, Robbins PD, Pap T, Evans CH, Gay S, Schölmerich J. Additive Hemmung der Knorpeldestruktion durch Doppelgentransfer im SCID Maus Modell der Rheumatoiden Arthritis. *Med. Klin* 96 (Abstract-Band I), 125, 2001.
32. Meyringer R, Distler O, Judex M, Szeimies R, Landthaler M, Kullmann F, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Analyse differentieller Genexpression in Hautfibroblasten von Patienten mit Sklerodermie mittels RAP-PCR für Differential Display. *Med. Klin* 96 (Abstract-Band I), 128, 2001.
33. Judex M., Neumann E, Distler O, Kullmann F, Grifka J, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Chemokine receptor CXCR4 mRNA expression is downregulated by prednisolone in rheumatoid arthritis (RA) but not in osteoarthritis (OA) synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 44, S110, 2001.

34. Neumann E, Judex M, Kullmann F, Anders S, Robbins PD, Gay RE, Pap T, Evans CH, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U. Cartilage protection by double gene transfer with Il-1ra and Il-10 in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis is mediated through the activin pathway. *Arthritis Rheum* 44, S181, 2001.
35. Neumann E, Judex M, Kullmann F, Fleck M, Perlick L, Robbins PD, Mountz JD, Gay RE, Evans CH, Pap T, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Triple gene transfer with Il-1ra, Il-10 and sTNFR is less cartilage protective than double gene transfer with Il-1ra and Il-10. *Arthritis Rheum* 44, S149, 2001.

## Für das RAP-PCR-Mikroarrayprojekt verwendete IMAGE-Klone

<b>Gen</b>	<b>Klon-ID</b>	<b>Vektor</b>
Beta-Aktin	3896211	pCMV-SPORT6
Beta-Aktin, Klon 2	2580289	pCMV-SPORT6
Activin	269815	pT3T7
AKT 1	345839	pT7T3D -Pac
Beta-2-Mikroglobulin	589937	pBluescript SK-
CXCR 4	79629	pBluescriptSK-
Cyclophilin A	590248	pBluescript SK-
Follistatin	434768	pT3T7
GAPDH	547140	pBluescript SK-
IL 21 receptor	3058412	pT7T3-Pac
p16INK4	4157145	pCMV-SPORT6
p33ING1	1328	pT3T7
p38alpha Variant 1	341768	pT7T3D -Pac
p38beta	3904378	pCMV-SPORT6
p38gamma	4153363	pCMV-SPORT6
SDF-1	1624062	pT7T3D-Pac
Thrombospondin 4	1817	pT3T7
VCAM1	44477	LafmBA

**Bedanken möchte ich mich bei...**

... Herrn PD Dr. Ulf Müller-Ladner für sein Vertrauen in mich bei der Vergabe des Themas sowie auch während der gesamten Zusammenarbeit. Seine Begeisterung für die Forschung und sein unerschütterlicher Optimismus waren eine grosse Hilfe. Trotz immenser Arbeitsbelastung war er jederzeit erreichbar und zu Diskussionen bereit. Die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen sowie die Zeit in San Diego, die er mir ermöglichte, trugen viel zur Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizontes bei.

... Herrn Prof. Dr. Reinhard Wirth, der dankenswerterweise nach meiner Diplomarbeit auch noch meine Promotion wissenschaftlich betreute.

... Herrn PD Dr. Frank Kullmann für die Co-Betreuung sowie die Etablierung der RAP-PCR in Regensburg und der transatlantischen Kooperation mit dem SKCC.

... Herrn Prof. Dr. Joachim Grifka und seinem Team, die den Probenfluss nie abreißen liessen.

... den Professoren Renate und Steffen Gay, die mit stetigem Interesse den Fortgang der Arbeit verfolgten und viele wertvolle Anregungen gaben.

... Elena und Sandra, die mich nicht nur im Labor geistig und körperlich fit hielten und immer zu Diskussionen (mal mehr, mal weniger sinnvoller Natur) bereit waren.

... Wibke und Birgit, ohne deren tatkräftige und kompetente Mitarbeit diese Arbeit so nicht zustande gekommen wäre. Ihr werdet mir fehlen!

... Olga, Andre, Sabine, Dagmar, Martin, Christina, Gaby, Georg und Chris, die ebenfalls alle ihren unverzichtbaren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit und dem hervorragenden Arbeitsklima im Labor geleistet haben.

... allen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, die die besondere Med I-Atmosphäre geschaffen haben und immer für Gespräche zur Verfügung standen.

... und natürlich Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich, der die Forschungsarbeit seiner Mitarbeiter durch seine Unterstützung und Anregungen stetig verbesserte.



## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
Martin Judex